

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la voie de biosynthèse de l'inule chez *Chicorium intybus* L.

BALLANT, Elisabeth

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX

NAMUR

Faculté des Sciences

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'INULINE
CHEZ *CICHORIUM INTYBUS* L.

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques

Elisabeth BALLANT
Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix

FACULTE DES SCIENCES

Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE LA VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'INULINE

CHEZ *CICHORIUM INTYBUS* L.

BALLANT Elisabeth

Résumé

La chicorée industrielle (*Cichorium intybus* L.) produit de l'inuline dont le degré de polymérisation (DP) varie avec la saison. Les propriétés agro-alimentaires et l'intérêt qu'on porte à ce polyfructane dépendent directement de son DP. Les chaînes longues jouent le rôle de fibre, alors que les courtes ont un pouvoir sucrant peu calorique. Les voies de synthèse et de dégradation de l'inuline sont dès lors étudiées au niveau moléculaire.

Le DP moyen de l'inuline diminue particulièrement suite à un stress au froid se produisant en arrière-saison. Cette modification peut s'expliquer par deux processus distincts, mais complémentaires : un ralentissement de la synthèse de l'inuline, et une augmentation de sa dégradation. L'étude concernant la dégradation étant par ailleurs en cours, notre travail envisage une modification de l'activité des deux enzymes principales intervenant dans la synthèse de l'inuline, à savoir la SST (sucrose : sucrose fructosyle transférase) et la FFT (fructane : fructane fructosyle transférase).

La première partie du travail a consisté, pour chacun des deux gènes impliqués, à déterminer par RT-PCR semi-quantitative l'évolution de leur niveau de transcription au cours de la saison. Ces données, mises en graphique et corrélées aux courbes de températures, montrent une nette diminution de l'expression du gène de la SST lorsque les températures passent sous 0°C, alors que l'expression de la FFT est relativement stable tout au long de la saison.

La deuxième partie du travail a été consacrée à l'étude du promoteur de la SST présentant une activité potentiellement dépendante du froid. Dans un premier temps, nous avons isolé ce promoteur grâce à la technique du Genome Walker. Ce promoteur, ainsi que des versions tronquées, a ensuite été placé devant le gène rapporteur GUS du plasmide binaire pBI121. Des plants de tabac et de chicorée ont été transformés par ces différentes constructions au moyen d'*Agrobacterium tumefaciens*. L'analyse histochimique des premiers plants de tabac transformés montre une activité dans les poils glandulaires pour toutes les constructions. Ces résultats préliminaires devront néanmoins être confirmés par l'analyse d'un plus grand nombre de régénérants pris dans différentes conditions environnementales. Enfin, ces résultats devront être comparés à ceux des plants de chicorées toujours en phase de régénération.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2002

Promoteur: J. Messiaen

Co-promoteur : P. Van Cutsem

Remerciements

Au terme de ce mémoire et des dix mois passés au laboratoire de biologie végétale, je tiens à remercier Monsieur le professeur Van Cutsem pour m'avoir accueillie et pour m'avoir suivie dans la recherche entreprise.

Merci aussi à mon promoteur, J. Messiaen, ainsi qu'à mon tuteur, N. Dauchot, pour m'avoir épaulée (tantôt dans la bonne humeur et les rires, tantôt avec plus de rigueur).

Je tiens également à remercier tous les membres du Jury, Messieurs Vandenhoute J. et Dauchot N. ainsi que Mesdames Raes M. et Bamps S., qui consacrent une partie de leur temps à la lecture et à la compréhension de ce manuscrit.

Je ne voudrais pas non plus oublier l'ensemble des chercheurs et techniciens de l'URBV sans qui mes connaissances ne seraient pas ce quelles sont aujourd'hui.

Peut-être un mot plus spécifiquement pour

- Françoise toujours présente lors de petits pépins moléculaires,
- Pierre sur qui j'ai pu compter lors de problèmes techniques,
- Laurence et Catherine pour leurs conseils de Culture In Vitro (et d'utilisation d'*Agrobacterium*)
- Jean-Mi, Cécile et Alexis venus récemment rajeunir les troupes
- Philippe et Alex qui m'ont supporté et taquiné, moi la seule fille, depuis le choix de notre option
- Françoise toujours présente lors de petits pépins ...non plus moléculaires, mais plutôt de mise en page (oups, le retrait n'est pas bon!)

Mes amis et ma famille ne sont pas non plus oubliés (même s'ils ne sont pas tous cités individuellement),

Et finalement un tout grand merci à vous tous qui tenez en mains ce travail, que ce soit par obligation, par intérêt, par curiosité,... : il est le résultat de quatre années passionnantes et enrichissantes.

Table des matières

| | |
|---|-----------|
| Chapitre 1 : Introduction..... | 6 |
| <i>A - La chicorée industrielle.....</i> | <i>7</i> |
| 1. <i>Cichorium intybus.....</i> | <i>7</i> |
| 2. <i>L'inuline.....</i> | <i>8</i> |
| <i>B - Les fructanes</i> | <i>11</i> |
| Introduction..... | 11 |
| 1. Les fructanes | 12 |
| 2. Nomenclature..... | 14 |
| 3. Métabolisme | 15 |
| 4. Fonctions..... | 18 |
| 5. Utilisations..... | 18 |
| <i>C - Les stress hydriques.....</i> | <i>20</i> |
| Introduction..... | 20 |
| 1. Réponses physiologiques aux stress hydriques..... | 20 |
| 2. Réponses génétiques aux stress hydriques..... | 23 |
| <i>D - Techniques d'analyse de promoteur.....</i> | <i>28</i> |
| 1. Etude des interactions ADN-protéines | 28 |
| 2. Utilisation de gènes rapporteurs..... | 33 |
| Chapitre 2 : Objectifs du mémoire..... | 35 |
| Chapitre 3 : Matériel et Méthode | 37 |
| <i>A - Techniques concernant les acides nucléiques.....</i> | <i>38</i> |
| 1. Extraction d'ADN génomique végétal..... | 38 |
| 2. Genome Walker | 38 |
| 3. Amplification de fragments d'ADN par PCR..... | 43 |
| 4. Electrophorèse sur gel..... | 43 |
| 5. Purification d'acides nucléiques..... | 45 |
| 6. RT-PCR semi-quantitative | 48 |
| 7. Dosage au spectrophotomètre..... | 48 |
| 8. Quantification des acides nucléiques dans un gel d'agarose | 49 |
| 9. Le clonage..... | 49 |
| 10. Préparation d'ADN plasmidique | 53 |
| 11. Séquençage..... | 55 |
| <i>B - Techniques de biologie végétale.....</i> | <i>56</i> |
| 1. Culture in vitro..... | 56 |

| | |
|---|------------|
| 2. Transformation de plantes par <i>A. tumefaciens</i> | 57 |
| 3. Mise en évidence de l'activité glucuronidase (<i>GUS</i>)..... | 59 |
| Chapitre 4 : Résultats et discussions..... | 60 |
| <i>A - Evolution du taux d'ARNm des FFT et SST</i> | 61 |
| 1. Transcription reverse (<i>RT</i>) | 61 |
| 2. Choix des amorces | 61 |
| 3. Test des amorces..... | 64 |
| 4. Mises au point de l'amplification en duplex et de la séparation des fragments..... | 66 |
| 5. RT-PCR (semi-quantitative) sur les gènes <i>FFT</i> et <i>SST</i> | 70 |
| 6. RT-PCR duplex semi-quantitative | 75 |
| <i>B - Analyse du promoteur</i> | 79 |
| 1. Genome Walker | 79 |
| 2. 2. Délétions du promoteur..... | 85 |
| 2. 2. Délétions du promoteur..... | 86 |
| 3. Culture in vitro et transformation de végétaux..... | 99 |
| Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives | 109 |
| Annexes | 112 |
| <i>Annexe 1: Agrobacterium (d'après [16, 72-75])</i> | 113 |
| <i>Annexe 2:</i> | 120 |
| Littérature citée | 121 |
| Abréviation | 126 |

Chapitre 1 : Introduction

A - La chicorée industrielle

1. Cichorium intybus

1.1. La systématique



| | |
|--------------------|---------------------------------|
| Embranchement | : Spermatophytes |
| Sous-embranchement | : Angiospermes |
| Classe | : Dicotylédones |
| Ordre | : Astérales |
| Famille | : Astéracées |
| Sous-famille | : Lactucoideae ou Cichorioideae |
| Genre | : Cichorium |
| Espèce | : <i>intybus</i> Linneus |

1.2. La production industrielle

La production de la chicorée industrielle remonte à l'époque de Napoléon I^{er} qui en 1806 déclare le blocus continental. Pour ruiner l'Angleterre les denrées coloniales britanniques ne peuvent plus être importées sur le continent européen [17, 18]. Les frontières sont ainsi fermées pendant sept ans au café et au sucre de canne, respectivement remplacés par la chicorée et la betterave sucrière. Les racines de chicorée sont hachées et torréfiées [19].

La chicorée industrielle aussi appelée chicorée à café, chicorée sauvage, chicorée des champs, chicorée commune, chicorée amère, écoubette, cheveux de paysan, barbe de capucin, laidéron ou encore yeux de chat [9, 20] est principalement cultivée en Flandre et dans le Nord Ouest de la France, dans le triangle Dunkerke-Calais-St Omer. La culture se fait de préférence dans des sols limoneux, sablo-limoneux voire sablonneux, dans des zones de climat maritime, doux et humide et caractérisé par des jours longs. En Belgique, *C. intybus* est cultivée pour deux entreprises sucrières : Warcoing Industrie, S.A. (à Pecq) et ORAFTI Group (à Oreye) pour la raffinerie Tirlemontoise [21].

Potentiellement, les rendements de la chicorée industrielle sont de 55 000 kg/ha, avec 15-17 % d'inuline. En général, ces rendements sont de l'ordre de 45 000 kg/ha, avec 15-16 % d'inuline. De bonnes conditions climatiques en favorisent la teneur.

Au cours de la saison, la plante modifie son contenu en sucre. En effet, le niveau de fructose est élevé jusqu'en novembre. Les diminutions observées par la suite sont compensées par une augmentation de la teneur en glucose. A partir de ce moment, la plante maintient donc sa production de fructose à un niveau élevé, alors que l'inuline produite a un degré de polymérisation (D.P.) plus faible ou commence à être dégradée. En automne, en fonction des facteurs climatiques, la production nette diminue pour finalement se stabiliser. La dégradation de l'inuline sous l'effet du froid continue et explique l'augmentation de la teneur en sucres [11].

Depuis quelques années la culture de chicorée industrielle est en pleine expansion ; en moins de dix ans, entre 1992 et 2000, ces surfaces sont passées de 1 400 à 10 930 ha, soit huit fois plus, et de 65 Tonnes/an en 1990 à 591 en 1997, soit neuf fois plus [22]. Le prix moyen de l'inuline peut être estimé, d'après les ventes de janvier 1995 à juin 2000, à 1834 €(74 000 Fb) la tonne. Pour les sirops, le prix dépend de la teneur en fructose : de 10 à 50 %, il faut compter 660 €(26 600 Fb) et au-delà de 50 %, 1550 €(62 500 Fb) la tonne.

Les utilisations de la chicorée sont très diverses mais appartiennent principalement aux domaines alimentaire et médical. Les extraits de plante peuvent servir à aromatiser des préparations culinaires, de l'eau, du lait ou être mélangés à du café et du chocolat [8]. Ils permettent d'apporter une coloration brun foncé et une nuance amère aux plats. Les feuilles peuvent être consommées crues, en salade. La consommation de cette plante favorise la disparition des troubles digestifs (perte d'appétit, affections hépatiques). Elle est également employée en phytothérapie pour combattre les troubles urinaires, l'eczéma, l'œdème, et la fièvre. Des vertus lui sont aussi conférées dans le traitement des rhumatismes, de la goutte, de la constipation, de la rétention d'urine, du diabète et lors de présence de parasites intestinaux. Elle intervient aussi dans la protection du colon contre le cancer. Oligofructoses et inuline peuvent quant à eux être extraits des racines. L'inuline est reconnue comme étant une substance bénéfique pour la santé, en augmentant le niveau de certaines bactéries gastriques utiles. Elle est utilisée sous forme d'infusions ou de décoctions [8-10]. Actuellement la culture sert principalement à la production de fibres d'inuline ou de sirop à haute teneur en fructose [8]. Les usages de ces produits sont multiples et seront détaillés dans le paragraphe suivant.

2. L'inuline

L'**inuline** est une fibre alimentaire soluble, constituée d'une chaîne de fructoses terminée par un résidu glucose (G1-2F1-2Fn). Elle se trouve dans de nombreuses plantes dont les Astéracées. Ce sucre de réserve n'est pas métabolisable par l'homme.

Bien que pouvant représenter 70 % du poids sec de la partie aérienne des graminées, elle est préférentiellement extraite de bulbes, de racines et de tubercules. L'extraction peut se faire à partir de quatre plantes : le dahlia, le topinambour, la chicorée ou encore l'agave. Cette dernière est cultivée au Mexique. Son jus, contenant de l'inuline, subit une fermentation par des levures

pour produire la célèbre tequila. Parmi les levures de fermentation, on retrouve *Saccharomyces cerevisiae*, ainsi que *Torulaspora delbrueckii*, *Kluyveromyces marxianus* et *Hanseniaspora spp.* et encore d'autres espèces [23]. Dans nos contrées, ce sont plutôt le topinambour et la chicorée industrielle qui sont cultivés.

L'inuline ne doit pas être considérée uniquement comme une source de sirop à haute teneur en fructose utilisé pour son pouvoir sucrant car ses applications dans le secteur non-alimentaires sont multiples [24]. En effet les fibres solubles jouent un rôle tout au long du tractus digestif. Dans l'estomac elles augmentent la viscosité du contenu gastrique et elles peuvent ralentir le temps mis pour atteindre l'intestin grêle. Cela a pour conséquence de diminuer chez l'individu la sensation de faim. Dans l'intestin grêle, l'environnement rendu visqueux diminue les possibilités d'absorption de nutriments. Enfin, l'inuline intacte atteint le colon où elle sera dégradée par la flore locale [7, 25], préférentiellement aux pectines, polydextroses ou fructoses. Elle y est hydrolysée par les endo- et exoinulinases, les invertases (ou ? -fructofuranosidases) et les transférases de bifidobactéries, en petits oligomères et en monomères qui sont ensuite métabolisés. Par ce processus de fermentation, ces bactéries anaérobies produisent de l'énergie pour se multiplier, mais aussi des gaz (CO_2 , H_2 , CH_4) et des petits acides gras organiques. L'acétate, le butyrate, le propionate et l'acide lactique libérés diminuent le pH. Ces conditions acides empêchent la croissance de bactéries pathogènes et putréfactives. Les bifidobactéries peuvent aussi produire des substances bactéricides pour des bactéries appartenant aux groupes des *Bacteroides* ou aux *Clostridium* telles les *C. perfringens*, [7, 26-29]. Elles nous protègent ainsi d'infections intestinales. Par ailleurs, le propionate est un inhibiteur de la synthèse du cholestérol produit au départ de l'acétate. En plus de cela, elles libèrent des vitamines B (B_1 , B_2 , B_6 , B_{12}), et les acides nicotinique et folique [30, 31]. Leur abondance prévient également de la constipation mais surtout des cancers du colon. Effectivement, un transit intestinal accéléré laisse moins de temps de contact entre les muqueuses et les carcinogènes potentiels. La présence d'une plus grande quantité d'eau, quant à elle, les dilue [7]. Qui plus est, les courtes chaînes d'acides gras libérées favorisent l'absorption et la rétention de calcium [32].

Dans le domaine alimentaire l'inuline connaît des utilisations diverses. Elle peut être ajoutée en tant que substrat prébiotique dans les yaourts contenant des bifidobactéries et des *Lactobacilli*. Elle leur sert de substrat et a un effet bénéfique sur leur croissance. Les temps de conservation de l'aliment sont alors moins réduits par rapport aux autres produits traditionnels supplémentés également en bactéries [7]. Les teneurs en graisses qui apportent goût et texture au produit peuvent être diminuées en utilisant des ingrédients qui les substituent ou qui les imitent : l'inuline fait partie de ces composés. Elle a la propriété de remplacer partiellement les caractéristiques sensorielles et fonctionnelles des graisses [33] tout en restant une fibre soluble non métabolisée par l'organisme. L'inuline est dès lors utilisée dans les gâteaux, les chocolats et autres produits quotidiens pour sa faible valeur calorique [34]. Qui plus est, l'hydrolyse des liaisons internes de l'inuline conduit à la libération de fibres solubles et/ou d'exhausteurs de goût pouvant conférer une impression de sucré aux produits « light » [35, 36].

L'inuline est aussi exploitée à des fins médicales. Elle joue un rôle intéressant pour les personnes souffrant de diabète. L'inuline n'étant pas assimilée par l'organisme, elle n'affecte pas le taux de sucre présent dans le sang et ne nécessite pas la production d'insuline. La quantité d'insuline exogène injectée peut ainsi être diminuée [37, 38]. L'inuline intervient dans les soins de maladies urogénitales. Les conjugués d'inulines sont rapidement excrétés par les reins sans être métabolisés; ils exerceraient leur activité pharmacologique directement sur le système urinaire [39]. Il existe également un test diagnostique des fonctions rénales (Inutest) utilisant une molécule analogue de l'inuline [40].

En pharmacologie, l'inuline permet la libération de substances actives dans le colon. En effet, il est intéressant que les substances actives ne soient libérées que dans les tissus cibles et dans les concentrations voulues ; des médicaments devant atteindre le colon ne doivent pas être libérés dans la première partie du tractus digestif ! Jusqu'en 1994 la plupart des firmes pharmaceutiques n'avaient toujours pas de solution à ce problème [41]. Une série de paramètres risquerait d'inactiver le médicament avant sa libération dans les tissus cibles ou de provoquer des effets secondaires. Or, le colon est caractérisé par la présence de microflore vivant en conditions anaérobies et capable d'hydroliser l'inuline. Dès lors, le coating de substance active peut se faire avec de l'inuline qui permettra une libération locale de la molécule dans le colon (Eudragit ®) [42]. La molécule d'intérêt est ainsi protégée des sucs gastriques et intestinaux.

B - Les fructanes

Introduction

Le carbone réduit est utilisé par la plante pour synthétiser des précurseurs du métabolisme et des carbohydrates. Ces derniers peuvent être subdivisés en deux grandes classes : les polysaccharides de structure et les polysaccharides de réserve.

Les polysaccharides de structure constituent une matrice extracellulaire plus ou moins compacte dans la paroi, autour de chaque cellule végétale. On y distingue la cellulose, l'hémicellulose et les pectines. La **cellulose** est une chaîne linéaire de quelques milliers de résidus glucoses liés en β -1,4. Elle représente 15 à 30 % du poids sec de la paroi primaire et plus encore dans la paroi secondaire. Les **pectines** sont des polysaccharides ramifiés, très hydratés, contenant de l'acide β -D-galacturonique. Les **hémicelluloses**, quant à elles, sont définies comme des polysaccharides ni celluloliques ni pectiques [43].

Les polysaccharides de réserve stockent le carbone réduit sous une forme osmotiquement inerte. L'**amidon** est l'un de ces polysaccharides. Il existe sous deux formes : l'amylose et l'amylopectine. Tous deux contiennent des résidus glucoses attachés par des liaisons β -1,4, l'amylopectine étant ramifiée grâce à des liaisons β -1,6. Dans la cellule végétale ces molécules sont accumulées dans les amyloplastes. L'amidon n'est pas soluble : cette accumulation passe donc nécessairement par une forme mobile dans la plante, étant donné que les lieux de synthèse et de stockage sont localisés à des endroits différents. C'est le **saccharose** qui est transporté dans les vaisseaux conducteurs depuis les feuilles, dans le chloroplaste où a lieu la photosynthèse, vers les organes de réserve ou les tissus non-photosynthétisants. Les **fructanes**, quant à eux, sont des polymères de fructoses et sont des polysaccharides de réserve. Ils sont accumulés dans la plupart des cas pour des espèces qui se développent dans des régions connaissant une saison sèche et froide. Les fructanes interviendraient en effet dans la protection contre la sécheresse en agissant comme osmolyte ou contre le froid grâce à un effet cryoprotecteur [44, 45]. Ces polysaccharides sont synthétisés par l'action concertée de plusieurs enzymes dont la 1-SST (sucrose:sucrose 1-fructosyle transférase). La 1-SST est une des enzymes clé de cette voie de biosynthèse puisque c'est elle qui produit, au départ de deux saccharoses, une molécule de 1-kestose, le plus petit des fructanes et l'accepteur nécessaire à la formation de fructanes de degré de polymérisation (DP) supérieur. Un des objectifs de ce mémoire consistera à étudier le promoteur responsable du contrôle de l'expression de cette enzyme. Attardons-nous maintenant un peu plus sur les produits formés à la fin de la voie de biosynthèse à laquelle appartient la SST : les fructanes.

1. Les fructanes

Les fructanes se rencontrent dans différentes familles de plantes : les *Liliales* (poireau, ail, oignon), *Poales* (blé, orge), *Asterales* (chicorée, topinambour), *Campanulales*, *Polemoniaceae*, *Ericales* et les *Dipsacales*. Ils sont aussi produits par de nombreuses bactéries dont des pathogènes de plante et des micro-organismes du système digestif de l'homme et d'animaux. Ce sont par exemple les *Bacillus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Erwinia* ou encore les *Actinomyces* [44].

La différence principale entre les fructanes synthétisés par des végétaux et les fructanes produits par des bactéries réside dans leur taille. En général, chez les végétaux, le degré de polymérisation varie entre 35 et 50, mais peut parfois atteindre 200 unités. Dans les cas des micro-organismes, le DP est même parfois supérieur à 100 000. La diversité de ces chaînes de sucre est plus importante chez les plantes [46] que chez les micro-organismes, où la structure semble être uniforme : les liaisons α sont généralement de type α -2,6 [47].

La structure générale des fructanes végétaux consiste en une chaîne de fructoses initiée par un résidu glucose en α -2,1. Il en existe cependant, chez les Astéracées, qui ne sont constitués que de fructoses [48].

Il existe cinq types de fructanes naturels, se distinguant par les liaisons des fructoses : les inulines, les levanes, les levanes mixtes, les inulines néoséries et les levanes néoséries.

Inulines

Ce sont des chaînes linéaires de résidus D-fructosyle liés en α -2,1 qui peuvent être notées G1-2F1-2Fn. Dans nos régions, on les rencontre principalement dans les plantes appartenant aux *Asterales* (chicorée et topinambour) [2, 3]. Leur DP est généralement compris entre 35 et 50.

La plus courte de ces molécules est un trisaccharide : le 1-kestose aussi appelé isokestose (fig. 1). Il résulte de l'action de la 1-SST sur une molécule de saccharose. L'ajout de résidus fructoses supplémentaires par la 1-FFT (fructane :fructane 1-fructosyle transférase) conduit aux chaînes d'inuline de DP supérieur.

Levanes

Ce sont des chaînes linéaires de résidus fructosyles liés en α -2,6 [1], aussi notés G1-2F6-2Fn. Ces fructanes sont présents chez certaines graminées [2] et chez presque toutes les bactéries.

Levanes mixtes

Ces fructanes possèdent à la fois des liaisons α -2,1 et α -2,6 [4]. Ils sont accumulés dans les *Poales* tels le blé et l'orge [2, 4]. Une de ces molécules est le bifurcose (fig. 2).

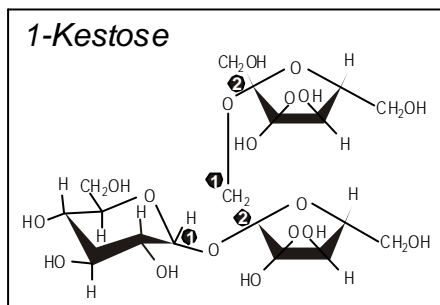


Figure 1a : Structure chimique de l'isokestose (la plus courte des inulines)

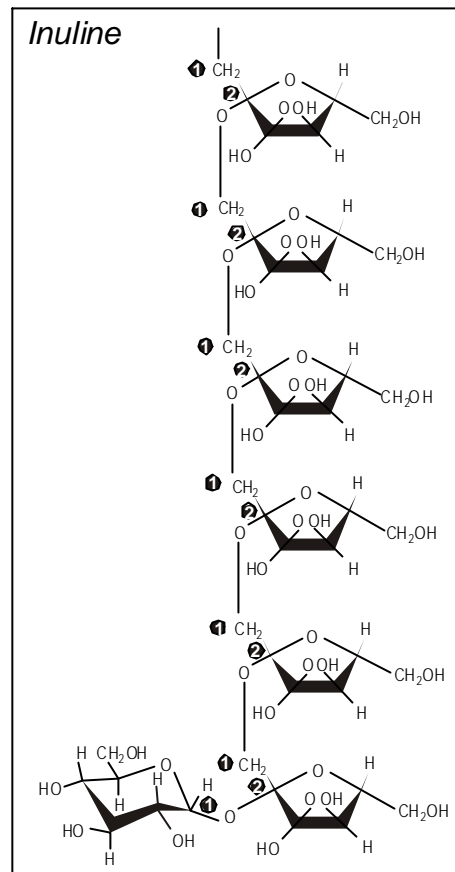


Figure 1b : Structure chimique d'une portion de molécule d'inuline

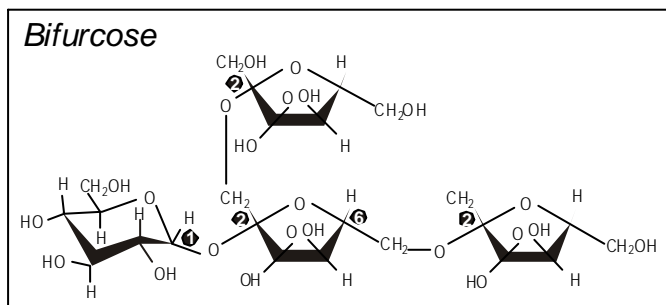


Figure 2 : Structure chimique du bifurcose (Levane mixte)

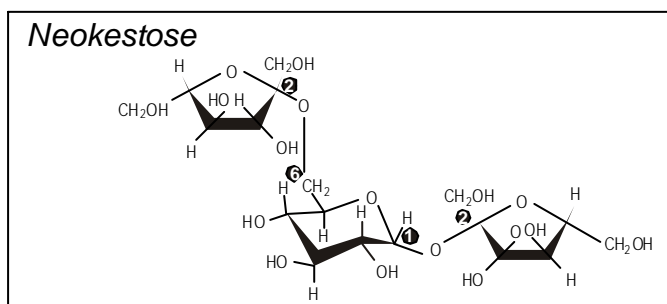


Figure 3 : Structure chimique du néokestose (la plus courte levane néosérie)

Inulines néoséries

Ces fructanes linéaires aux liaisons β -2,1 sont liés à la fois aux carbones 1 et 6 du glucose intervenant dans la composition du saccharose. Il s'agit de polymères de fructane constitués d'un glucose avec à chacune de ses extrémités une chaîne de fructoses. La notation est donc la suivante : mF2-1F2-6G1-2F1-2Fn. On peut les trouver chez des plantes appartenant aux *Liliaceae* telles l'asperge ou l'oignon [6]. Le néokestose (fig. 3) est la plus courte molécule de ce type.

Levanes néoséries

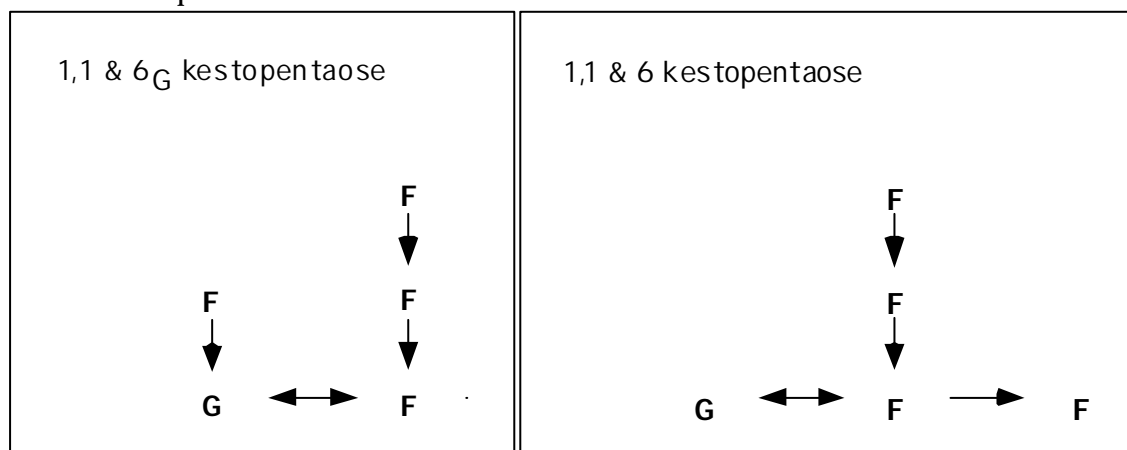
Comme pour les inulines néoséries, les chaînes de fructoses sont fixées à une molécule de glucose. Dans ce groupe de sucres, les liaisons sont de type β -2,6. Ces sucres sont peu présents dans le monde végétal; on en trouve quelques espèces appartenant aux *Poales* parmi lesquelles l'avoine [5].

2. Nomenclature

La nomenclature n'existe que pour les fructanes courts à plus de trois résidus. La plus simple est celle utilisée par Waterhouse et Chatterton (1993) [49]. Les liaisons sont facilement identifiées par le nom donné à la molécule. L'inconvénient de cette nomenclature réside dans le manque de précision lorsqu'il y a plus de trois embranchements.

Le nom commence par kesto-. On y ajoute la racine grecque correspondant au degré de polymérisation. La désinence est en -ose. Les composés sont cités à partir du saccharose. Quand les chaînes sont attachées à la fois au fructosyle et au glucosyle du saccharose, le fructose est cité en premier; la liaison au glycosyl est alors indiquée en indice. Au point de ramification, c'est la liaison au premier carbone qui est d'abord citée. A chaque embranchement chaque liaison est nommée et séparée par le sigle "&". Quand la liaison est située avant la ramification, la séparation se fait par une virgule.

Exemples :



3. Métabolisme

3.1. Biosynthèse

La voie de biosynthèse des fructanes a été élucidée pour la première fois par Edelman et Jefford (1968) chez le topinambour [1]. A l'époque, toutes les confirmations de résultats n'ont pu être apportées, les enzymes n'ayant pas été complètement purifiées ! Néanmoins la théorie principale était là et, par la suite, a été confirmée par l'utilisation d'enzymes purifiées de tubercules de topinambour dans la synthèse *in vitro* de fructanes [3].

C'est le saccharose qui sert de substrat pour la synthèse des fructanes dans la vacuole. Dès lors, la production de fructane dépend de la lumière puisque la disponibilité en saccharose varie avec l'importance de la photosynthèse [50].

Selon le modèle d'Edelman et Jefford, les fructanes, et par conséquent l'inuline, sont synthétisés par l'action combinée de deux enzymes : les 1-SST et 1-FFT.

La **1-SST** est une enzyme dimérique glycosylée de 69 kDa. Elle est constituée d'une sous-unité de 49 kDa et d'une autre de 24 kDa. Elle fonctionne de manière optimale à un pH compris entre 5 et 5.5 qui correspond à un environnement vacuolaire. Elle est l'enzyme clé de la synthèse des fructanes en catalysant la première étape de la synthèse des fructanes dans les plantes : elle transforme deux molécules de saccharose en une molécule de 1-kestose et libère un glucose [51, 52].



D'après CAIRNS A. - 1993 - *New Phytol.* Vol. 123, 15-24

Cette réaction est irréversible. En effet, en présence de la 1-SST, trisaccharide et glucose ne sont pas transformés en saccharose, l'énergie libérée lors de ce transfert étant plus importante que dans la plupart des autres oligo- et polysaccharides.



D'après CAIRNS A. - 1993 - *New Phytol.* Vol. 123, 15-24

La **1-FFT** (fructane : fructane 1-fructosyle transférase) utilise le trisaccharide produit par la SST comme substrat pour la synthèse de l'inuline d'un degré de polymérisation supérieur. Elle transfère le fructosyle entre les molécules de fructanes.

Le sens de la réaction dépend de la longueur de la chaîne et des concentrations des donneurs et accepteurs. Dans la réaction catalysée par la 1-FFT, le saccharose ne peut servir de donneur de fructosyl. Il peut tout au plus servir d'accepteur.

Différentes FFT ont été identifiées; elles seraient responsables de la diversité de longueur des fructanes présents dans la nature [53].

3.2. Dégradation

La dégradation des fructanes a lieu, lors de la période de dormance de la plante, par des hydrolases. Le degré de polymérisation des fructanes diminue et il y a davantage de saccharose et d'oligomères. Ces derniers sont des chaînes d'une taille inférieure à dix résidus; au-delà on utilisera le terme de "polymère". La dépolymérisation s'accélère avec les baisses de températures [54]. Ce phénomène est comparable à la transformation, induite par le froid, de l'amidon en sucre dans les pommes de terre.

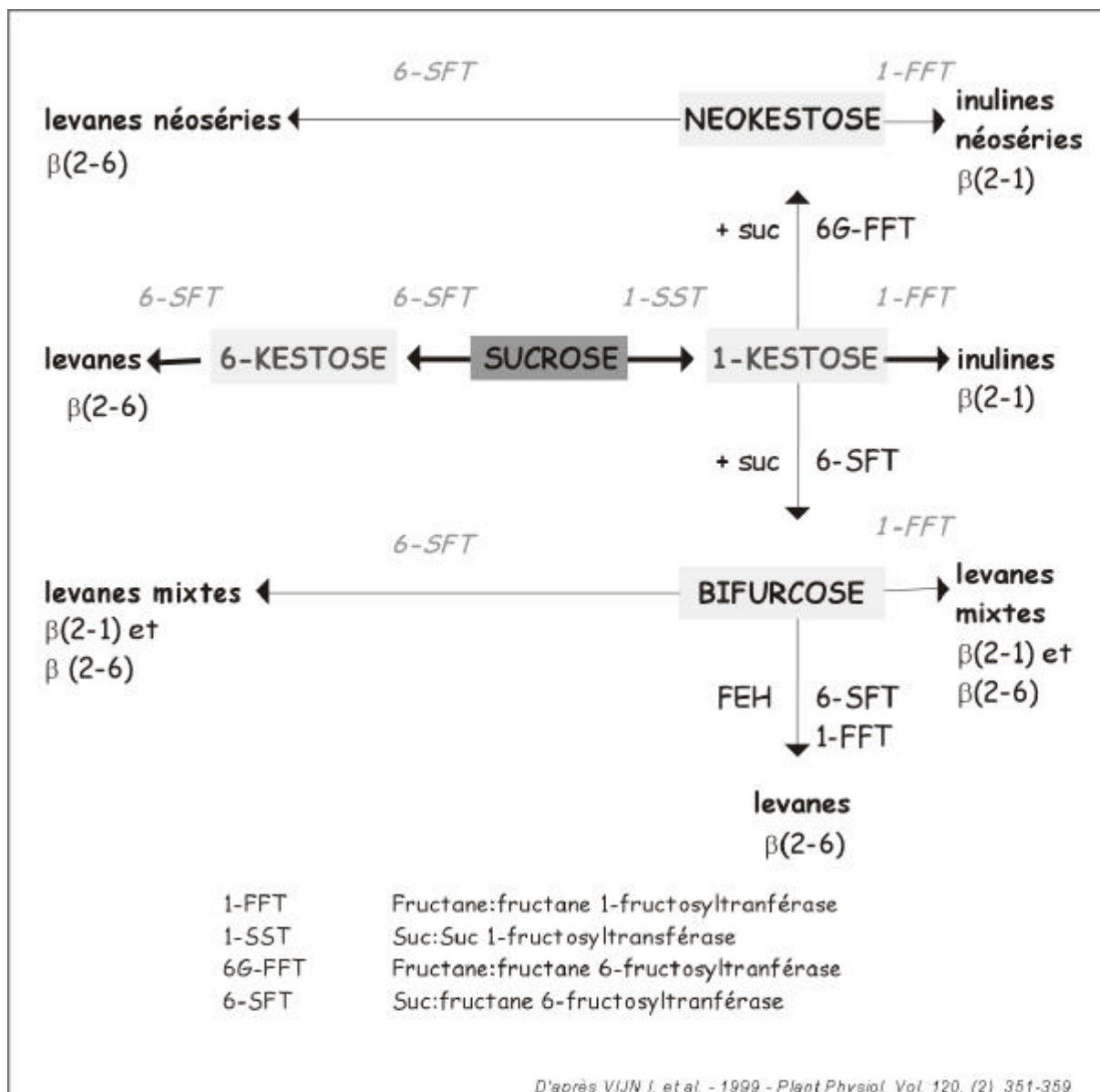
Dans le cas des fructanes la dégradation s'effectue par une fructane-1-exohydrolase (1-FEH), aussi appelée inulinase : elle hydrolyse le résidu fructosyl terminal. Dans la chicorée industrielle, deux isoformes de cette enzyme ont été purifiés et caractérisés. La première en 1990 par Claessens est la 1-FEH I : ce polypeptide unique glycosylé a un poids moléculaire (PM) de 70 kDa et fonctionne à pH 5.0 qui correspond probablement à un environnement vacuolaire. Son activité enzymatique serait aussi légèrement inhibée par le saccharose ; ce mécanisme pourrait servir de contrôle négatif lors du processus de dégradation des fructanes [55]. La seconde, la 1-FEH II a été purifiée en 1999 par Van den Ende. Elle est caractérisée par un PM proche de 64 kDa, un pH optimal de fonctionnement compris entre 5 et 5.5 et un optimum de température de 35°C. Elle est aussi fortement inhibée par le saccharose [56]. Dans le topinambour la 1-FEH a une action spécifique sur les oligo- et les polymères de fructanes alors qu'elle est inactive sur le saccharose. Suite à la libération de fructose, du saccharose est produit et pourra être exporté dans la plante [12]. Il peut aussi servir d'accepteur de fructosyle lors du transfert catalysé par la FFT. Lors d'une diminution subite de la température, l'activité 1-FEH augmente et conduit à une augmentation des fructoses libres [52]. La dégradation des fructanes en fin de croissance de la plante diminue significativement le taux d'inuline et représente un désavantage pour l'extraction industrielle de l'inuline au départ de racine de chicorée [56]. L'action combinée de la FEH et de la FFT réduit le degré de polymérisation moyen du fructane stocké.

Des invertases sont aussi impliquées dans le métabolisme des sucres en question : elles clivent les molécules de saccharose en glucose et fructose [57]. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, bien que localisée et active dans la vacuole, la 1-FEH est davantage homologue aux invertases pariétales qu'aux invertases vacuolaires et aux fructosyltransférases [58].

Les fructanehydrolases (FH) quant à elles libèrent les unités fructoses de fructanes avec le saccharose comme produit final. La β -fructofuranosidase est une de ces enzymes [53].

3.3. Modélisation

D'autres enzymes sont impliquées dans la production de fructanes. Selon un modèle général, la synthèse des différents fructanes dans les plantes peut se résumer de la manière suivante[59] :



Ce modèle suggère que le saccharose est le seul substrat pour la synthèse *de novo* de fructanes [48].

4. Fonctions

Synthétisés dans la vacuole, les fructanes servent principalement de réserve de carbohydrates. La synthèse des fructanes peut contrôler la concentration en saccharose dans la vacuole. Par l'utilisation de saccharose dans la polymérisation des fructanes, la concentration en sucre dans la cellule diminue. La plante évite ainsi le contrôle négatif sur la photosynthèse [53]. Les fructanes peuvent être accumulés dans la vacuole et atteindre jusqu'à 70 % de son poids sec, sans empêcher la photosynthèse. De plus, contrairement à l'amidon, les fructanes restent solubles [59].

Les fructanes joueraient un rôle dans l'adaptation aux stress hydriques : stress au froid et stress dû à la sécheresse (voir Chap. I – C) . En effet, on constate que les plantes accumulant les fructanes sont abondantes dans les zones de climat tempéré, avec saison sèche et froide, alors qu'elles sont quasi absentes des régions tropicales [44]. A des températures inférieures à 10°C, la biosynthèse de l'amidon diminue fortement tandis que la production de fructanes et la photosynthèse sont moins sensibles à ces basses températures [53]. L'accumulation de fructanes est donc un avantage pour les plantes photosynthétiquement actives durant l'hiver et au début du printemps.

De plus, la modification du degré de polymérisation dans la vacuole permet à la plante d'adapter son potentiel osmotique sans devoir produire de nouveaux carbohydrates [45].

L'implication des fructanes dans la tolérance au froid et à la sécheresse est souvent évoquée [60], mais l'étude de la résistance à un stress environnemental n'est pas aisée. Il est difficile d'établir une corrélation directe entre le stress et l'accumulation de fructanes. Des études ont été réalisées en introduisant une levansucrase de bactérie dans une plante ne produisant pas de fructanes [45]. Une autre approche consiste à inhiber la synthèse des fructanes par les procédés de cosuppression et d'anti-sens ou d'ARNi.

5. Utilisations

Les fructanes, d'origine végétale ou bactérienne, sont utilisés dans l'industrie alimentaire mais aussi dans d'autres secteurs industriels (voir section Inuline). Les fructanes courts ont un goût sucré alors que les chaînes longues interviennent dans des émulsions et servent d'agent de texture. Dans ce cas, leur goût est neutre. Les fructanes courte-chaîne ne sont pas métabolisés par l'homme. Et donc, tout en apportant aux aliments plus de goût que le saccharose, les fructanes sont moins caloriques.

L'inuline est synthétisée par la chicorée mais l'inconvénient des fructanes végétaux réside dans le fait qu'ils ont un faible degré de polymérisation et qu'ils sont dégradés lors du stockage. Des modifications apportées dans les voies de dégradations pourraient éviter ces diminutions de DP. Les plants transgéniques recevant encore à l'heure actuelle peu d'avis favorable, c'est plutôt la voie de la sélection qui est envisagée. Les plantes ayant naturellement le moins de sensibilité au froid et la meilleure conservation de longues chaînes pourraient être sélectionnées via des marqueurs moléculaires et seraient alors conservées et multipliées préférentiellement aux autres plants.

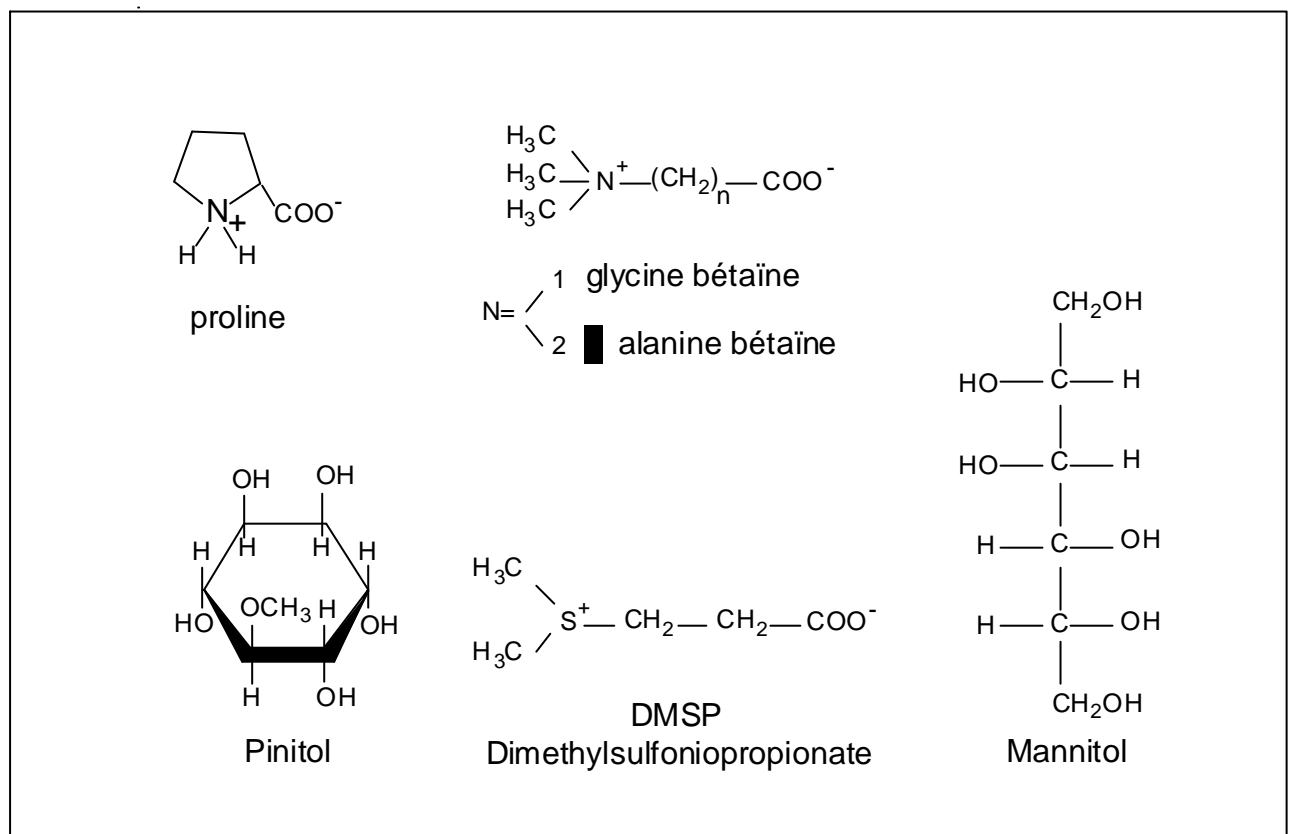


Figure 4: Les osmolytes (proline, b\^eta ine, pinitol, DMSP, mannitol) impliqu\^es dans la r\^eponse aux stress hydriques

C - Les stress hydriques

Introduction

Les stress hydriques sont provoqués par différents facteurs abiotiques tels que le froid, la chaleur, la sécheresse ou une salinité élevée : à chaque fois, la disponibilité en eau dans la plante est altérée. Dans des conditions de salinité élevée, les racines ont en effet plus de difficultés à extraire l'eau du sol car le potentiel osmotique du milieu est supérieur à celui de la plante.

En ce qui concerne le froid, des cristaux peuvent se former à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. Ces cristaux ont également pour conséquence une variation de potentiel hydrique entre l'espace intra- et extracellulaire.

Enfin, en réponse à la chaleur, la plante modifiera l'ouverture de ses stomates dans le but de limiter l'augmentation de sa transpiration. Différentes réponses physiologiques et génétiques ont ainsi été développées par les plantes pour lutter contre les stress hydriques. Celles-ci vont être détaillées dans les paragraphes suivants.

1. Réponses physiologiques aux stress hydriques

Pour faire face aux stress abiotiques auxquels ils sont confrontés, les végétaux possèdent différents moyens de lutte. Les plantes sont tout d'abord capables de contrôler le potentiel osmotique de leurs cellules. Elles peuvent aussi stabiliser les membranes en utilisant des sucres, des phospholipides, ou encore des protéines spécifiques; certaines peuvent, entre autres, intervenir dans la réparation ou la dégradation de protéines altérées.

1.1. Ajustement osmotique

Les premiers lieux qui subissent des dommages lors de stress hydriques sont les membranes cellulaires [61]. Lorsque la température baisse, et devient inférieure à 0°C, la formation de glace débute dans les espaces intercellulaires : le fluide extracellulaire a un point de congélation plus élevé, les concentrations en solutés y étant plus basses que dans le fluide intracellulaire. La formation de glace extracellulaire cause une diminution du potentiel hydrique hors de la cellule. Il y a dès lors des déplacements d'eau non gelée depuis l'intérieur de la cellule vers les espaces intercellulaires. En dessous de -10°C, plus de 90 % de l'eau osmotiquement active sort de la cellule [14].

L'ajustement osmotique consiste à faire varier la concentration de solutés dans la cellule. De petites molécules organiques, les osmolytes, peuvent être synthétisées [13]. Il est important de souligner que le métabolisme n'est pas perturbé par la présence de ces petites molécules solubles. Parmi ces produits, on peut distinguer la proline, le DMSP (diméthylsulfoniopropionate), les bêtaïnes, le pinitol, le mannitol, ... (fig. 4). Des solutés peuvent aussi être obtenus par

dégradation, plutôt que par synthèse. En effet, en situation de stress, l'amidon est dégradé en glucose et les fructanes sont transformés en fructose. Glucose et fructose non seulement pour ajuster le potentiel osmotique mais aussi pour subvenir aux besoins métaboliques de la plante.

Contrairement à ce qu'on pourrait imaginer, les ions ne sont pas utilisés pour modifier la pression osmotique cellulaire. Les sels pourraient en effet introduire des modifications à plusieurs niveaux de l'organisation cellulaire : activités enzymatiques, propriétés des membranes, contenus vacuolaires, ...

Néanmoins, on observe que des gènes codant pour des transporteurs d'ions sodium, pour des aquaporines, pour des protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant) ou pour des osmotines, peuvent être activés en cas de stress hydrique. Les osmotines sont des protéines PR (Pathogenesis-Related) formant des complexes qui interagissent avec la glace. Elles empêchent de cette manière la croissance des cristaux [13].

Les protéines LEA (Late Embryogenesis Abundant), décrites pour la première fois dans le cadre de la dessiccation lors du développement de la graine, sont très hydrophiles. Elles interviendraient dans la fixation de l'eau. Alors que la dessiccation peut mener la plante à la fanaison, ces protéines permettraient d'y maintenir le minimum d'eau nécessaire; évoquons par exemple le cas de la protéine Em du blé [15]. Celle-ci est nettement plus hydratée que la plupart des polypeptides globulaires. Lors d'une déshydratation importante, la perte d'eau peut conduire à la cristallisation de composés présents à l'intérieur de la cellule, avec pour conséquences des dégâts dans les structures cellulaires. En absence d'eau, on constate également que les protéines LEA jouent le même rôle que les sucres dans le maintien de la structure du cytoplasme, et ce sans pour autant présenter les problèmes pouvant apparaître avec les sels : de ce fait ils sont considérés comme étant des "solutés compatibles" [15].

1.2. Rôles des sucres

Un des processus indispensables à l'acclimatation au froid est la stabilisation des membranes, principalement par désaturation des acides gras qui les constituent. L'accumulation de saccharose et d'autres sucres simples lors du phénomène d'acclimatation semble également contribuer à cette stabilisation et protège les membranes des dégâts causés par le froid, du moins *in vitro*. Dans ce cas, le sucre se lie au phosphate du phospholipide [15].

Le trehalose serait le sucre osmoprotecteur le plus efficace comme en témoigne sa faible concentration minimale [62], cependant il est très rare chez les plantes. Le saccharose, avec les autres sucres, sert de substitut. Les sucres saturent le liquide cytoplasmique et conduisent à la formation d'un milieu visqueux qui ralentit la formation de cristaux dans la cellule. De plus, les sucres servent de solutés compatibles pour l'ajustement osmotique [15]. Une fonction supplémentaire des sucres dans la cellule est de faire face aux espèces actives de l'oxygène. Notons cependant que les sucres seuls ne protègent pas suffisamment la plante : les autres agents protecteurs décrits dans ce chapitre doivent intervenir en même temps.

L'accumulation de sucres et les modifications de compositions lipidiques ne nécessitent pas de modifications d'expression de gènes. Elles peuvent provenir de modification d'activité

d'enzymes impliquées dans leur synthèse [14]. Toutefois, certaines variations d'expression peuvent exister afin de lutter contre la dessiccation. Chez *Craterostigma plantagineum*, on observe en effet que le taux de sucrose-phosphate synthase ou de sucrose synthase augmente immédiatement en réponse à la sécheresse [15].

1.3. Protection, réparations, détoxifications

Le froid induit la production d'espèces réactives de l'oxygène qui peuvent intervenir dans les dégradations cellulaires [63]. Effectivement, lors de stress hydrique, le contenu en eau des feuilles diminue et, suite à la fermeture des stomates, la disponibilité en dioxyde de carbone baisse, la photorespiration s'enclenche et des espèces actives de l'oxygène sont produites. Dans de telles conditions environnementales, l'activité glycolate oxydase augmente et aboutit à la production d' H_2O_2 . C'est ainsi que les enzymes impliquées dans la détoxification des espèces actives de l'oxygène sont plus abondantes lors du stress; ce sont par exemple les glutathione réductase et superoxyde dismutase [15].

Aux faibles températures, les protéines sont aussi dénaturées. Des effets protecteurs peuvent provenir de mécanismes antioxydatifs, de l'augmentation des sucres dans l'espace apoplastique et de l'induction de gènes codant pour des chaperones.

Les protéases sont caractéristiques du métabolisme des cellules stressées. Elles dépolymérisent les polypeptides de réserve de la vacuole et libèrent des acides aminés nécessaires à la synthèse de nouvelles protéines. Une série de gènes induits par la sécheresse codent pour des protéases, ou plutôt pour des protéines présentant des similarités de séquence avec des protéases. L'une des fonctions de ces enzymes serait de dégrader les protéines gravement endommagées suite aux effets de la sécheresse. D'ailleurs, chez *A. thaliana*, le niveau d'expression de l'ARNm codant pour de l'ubiquitine augmente considérablement en cas de stress. Or cette petite protéine intervient dans le marquage des protéines à détruire [15].

Les protéines peuvent également être modifiées par des processus chimiques tels la déamination, l'isomérisation ou l'oxydation : c'est pour cela que les enzymes de réparation sont surexprimées en réponse au froid. De même, des gènes de séquences proches de celles des heat-shock proteins (*hsp*) sont exprimés. Ce sont probablement des chaperonines impliquées dans la réparation protéique en aidant les autres protéines à retrouver leur conformation native après avoir été dénaturées ou mal repliées pendant le stress hydrique. D'autres protéines ont pour rôle de séquestrer des ARNm spécifiques dans les cellules soumises au froid [15].

1.4. Perception du stress : messagers secondaires et molécules signal

Les signaux environnementaux sont perçus par des récepteurs spécifiques qui, après avoir été activés, initieraient une cascade de transduction du signal dans la cellule et y activeraient fréquemment des facteurs de transcription nucléaires. Aucun récepteur pour le froid, la salinité, la sécheresse ou le stress par l'ABA n'a encore été identifié avec certitude à l'heure actuelle.

Cependant, il semblerait que les protéines RLK, (receptor-like kinase, histidine kinase à deux composants) ainsi que les récepteurs associés aux protéines G, soient des senseurs potentiels de ces signaux [64].

La phosphorylation et la déphosphorylation de protéines (via des kinases et des phosphatases) constituent les principaux mécanismes d'intégration du signal dans les cellules eucaryotes après la perception du signal. Deux gènes d'*A. thaliana* induits par la déshydratation et codant pour des kinases calcium-dépendantes ont été identifiés. Ces enzymes participeraient à un processus de phosphorylation en réponse à la sécheresse. Le substrat de ces kinases n'est pas connu et leur rôle exact reste obscur.

Le calcium cytoplasmique agit comme messenger secondaire dans beaucoup de processus cellulaires et semble également être impliqué dans la transduction du signal qui active l'expression des gènes liés à la sécheresse [15]. En effet, la fermeture des stomates, une des premières réponses observées en cas de stress hydrique, est accompagnée d'une augmentation de concentration en calcium cytoplasmique libre et de modifications de pH. Ces événements cytosoliques sont considérés comme les préliminaires à la perte de la turgescence des cellules de garde des stomates, processus médié par l'acide abscissique (ABA).

2. Réponses génétiques aux stress hydriques

2.1. Les gènes de tolérance au froid

La machinerie cellulaire qui conduit à l'expression de gènes induits par le stress hydrique est semblable au modèle cellulaire général : une cascade complexe de transduction du signal aboutit à l'expression de gènes. Cette cascade comporte plusieurs étapes dont la perception du stimulus, l'amplification, l'intégration du signal et la réponse comprenant l'expression *de novo*. Il y a peu de données moléculaires quant à la perception du stress de dessiccation. Les modifications de pression dues à la perte de la turgescence seraient déjà un signal physique en lui-même pouvant "alerter" la cellule [15].

Des études génétiques classiques ont montré que la capacité des plantes à s'acclimater au froid est un caractère quantitatif qui implique l'action de plusieurs gènes, avec des petits effets additifs. Trois approches ont permis de déterminer la nature de ces gènes et leurs rôles dans la tolérance au froid : (1) l'isolement et la caractérisation de gènes induits lors de l'acclimatation, (2) l'isolement et la caractérisation de mutants touchés dans la tolérance au froid et (3) l'identification de QTL utilisant des sondes moléculaires spécifiques des loci de tolérance au froid.

De plus, le calcium joue un rôle important dans la signalisation : c'est un messenger secondaire universel. Chez *Arabidopsis* et la luzerne, le niveau de calcium cytoplasmique augmente rapidement en réponse aux basses températures. Cette augmentation est requise pour une expression complète de la plupart des gènes COR (Cold Regulated). Parmi ces gènes, un grand

nombre code pour des protéines dont l'activité enzymatique pourrait contribuer à la tolérance. Par exemple, le gène *FAD8* d'*Arabidopsis* code pour une désaturase d'acide gras qui peut contribuer à la tolérance en modifiant la composition lipidique des membranes. Les gènes de réponse au froid codant pour des chaperones peuvent protéger les protéines de la dénaturation, les gènes *hsp70* chez l'épinard et *hsp90* de *Brassica napus* par exemple. D'autres gènes codant pour des protéines intervenant dans la transduction du signal ont été identifiés : des MAP-kinases, des MAP kinase kinase kinase et des protéines 14-3-3. Ces protéines peuvent agir en contrôlant l'expression de gènes de la tolérance au froid ou en régulant l'activité de protéines impliquées dans le phénomène d'adaptation [14].

Chez *Arabidopsis thaliana*, les gènes *COR* (cold-regulated) portent plusieurs dénominations : *LTI* (low temperature induced), *KIN* (cold-inducible), *RD* (responsive to dessiccation) et *ERD* (early dehydration inducible). Ils comprennent quatre familles de gènes dont chacune est représentée par deux gènes liés physiquement sur le génome. Au moins un gène de chaque paire est induit par un stress hydrique, par une salinité élevée ou par l'ABA. L'induction de ces gènes est possible en surexprimant le facteur de transcription CBF1 (CRT/DRE binding factor). Dans ces conditions, il active leur expression sans stimulus de basse température. Il est ainsi vérifié que CBF1 se lie aux éléments *CRT* (C-repeat)/*DRE* (drought responsible element) présents dans le promoteur des gènes dont l'expression est régulée par le froid [65].

Le transcrit CBF commence à s'accumuler dans les quinze minutes qui suivent l'exposition au froid (fig 5a) grâce à un facteur de transcription déjà présent aux températures élevées qui reconnaît le promoteur de *CBF*. L'induction des gènes *COR* impliquerait une cascade au niveau des activateurs transcriptionnels. L'activateur non connu, appelé ICE (pour Inducer of *CBF* expression), serait inactif aux températures élevées : il pourrait être séquestré dans le cytoplasme par une protéine de régulation négative, ou avoir une conformation l'empêchant de se lier à l'ADN. Le facteur ICE serait activé par la faible température qui lui permettrait d'activer l'expression du gène *CBF*.

Chez l'épinard, ce sont les gènes *CAP* (cold acclimation protein) qui sont induits pendant l'adaptation au froid. Certains de ces gènes, *CAP85* par exemple, et *CAP160* sont aussi exprimés lors de déshydratation ou en réponse à l'ABA (Acide Abscissique). Ils codent pour des protéines qui stabilisent la membrane plasmique et la protègent de dommages causés par le froid.

D'autres protéines interviennent dans la tolérance au froid. Ce sont, par exemple, les cryoprotectines de l'épinard, les protéines WSC120 du blé et des protéines antigel décrites pour le seigle, diverses céréales et la carotte.

2.2. Régulation de l'expression

Les promoteurs de certains gènes répondant au froid sont activés à la fois par les faibles températures et par la déshydratation [14]. Les gènes activés lors de stress hydrique appartiennent

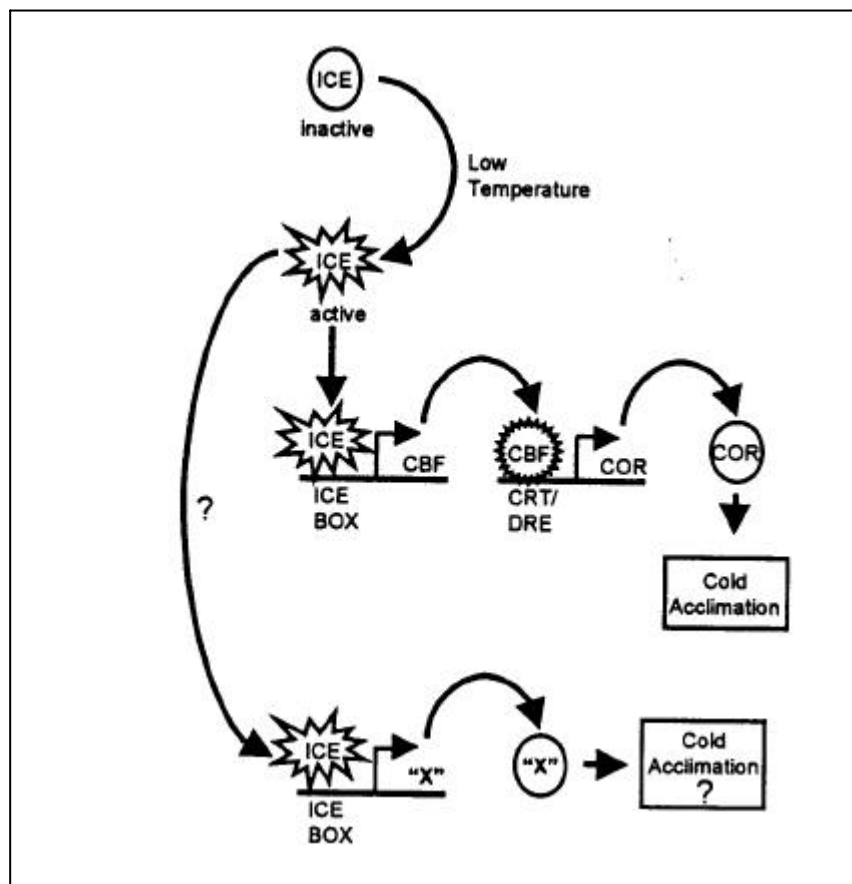


Figure 5a : Induction du facteur CBF par l'activateur "ICE" (Inducer of CBF expression) lors d'un stress au froid.

à une voie dépendante de l'ABA ou à une voie indépendante de l'ABA (fig. 5b). Généralement, les plantes tolérantes au froid accumulent de l'acide abscissique (ABA). Des études ont été réalisées par l'utilisation de mutants *aba* (défectueux dans la synthèse de l'ABA) et *abi* (insensibles à la présence d'ABA). Ces plants *abi* sont moins sensibles à l'ABA que des plants normaux.

Dans la voie dépendante de l'ABA, les variations du niveau d'expression des ARNm induites par le stress peuvent être mimées par un traitement à l'ABA. Dès lors, l'ABA a été utilisé pour définir les éléments *cis* et *trans* responsables du contrôle de l'expression de gènes sensibles à l'ABA.

L'élément *cis* le mieux caractérisé dans le cas de la sécheresse est l'élément ABRE (ABA responsive element). Cette séquence contient le motif palindromique CACGTG, avec la boîte-G (ACGT) comme élément central. Cet élément de base se rencontre dans toute une série de gènes végétaux régulés par divers facteurs environnementaux et physiologiques. Ce sont les nucléotides flanquant la boîte-G qui font la spécificité de l'interaction ADN-protéine (facteur de transcription) ainsi que l'activation qui en découle.

Les meilleurs exemples de ces éléments ABRE sont Em1a du gène *Em* chez le blé et MotifI du gène *rab16A* chez le riz. Lorsque plusieurs copies multiples de ces éléments sont fusionnées avec le promoteur CaMV35S minimal associé à un gène rapporteur, on confère à la construction l'inductibilité par l'ABA. La présence d'une seule copie n'est pas suffisante pour obtenir une réponse en présence d'ABA[15]. Des recherches effectuées par EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) et footprinting (voir Chap I – D) ont montré l'interaction entre les éléments Em1a et MotifI avec des protéines nucléaires. Ces protéines de liaison à l'ADN sont exprimées de manière constitutive, indépendamment de l'ABA. Il semblerait qu'elles n'interviennent pas directement dans l'activation par l'ABA mais qu'elles interagiraient plutôt avec d'autres facteurs de transcription.

A côté de la voie dépendante de l'ABA, des voies de transduction du signal indépendantes de l'ABA ont également été mises en évidence chez *A. thaliana*. Les gènes *rd29A* et *rd28B* sont induits distinctivement dans des conditions de déshydratation, de stress salin ou hydrique et lors de traitements à l'ABA.

Le promoteur du gène *rd29A* possède au moins deux éléments *cis* : les éléments DRE et ABRE. L'élément *cis* DRE (dehydration responsive element), de séquence 5'-TAC-CGA-CAT-3', intervient pour une réponse rapide face à la déshydratation, les baisses de température ou le stress salin. La séquence DRE est reconnue par les facteurs de transcription DREB. Le fragment de promoteur contenant l'élément ABRE conduit à une réponse plus lente.

Bien qu'il existe plusieurs classes de facteurs de transcription, il ne semble pas qu'il y en ait une qui intervienne en particulier dans l'activation des gènes de réponse aux stress abiotiques. D'ailleurs, plusieurs types de facteurs de transcription peuvent réguler l'expression d'un groupe de gènes ou plusieurs facteurs de transcription peuvent activer coopérativement le même gène [64]

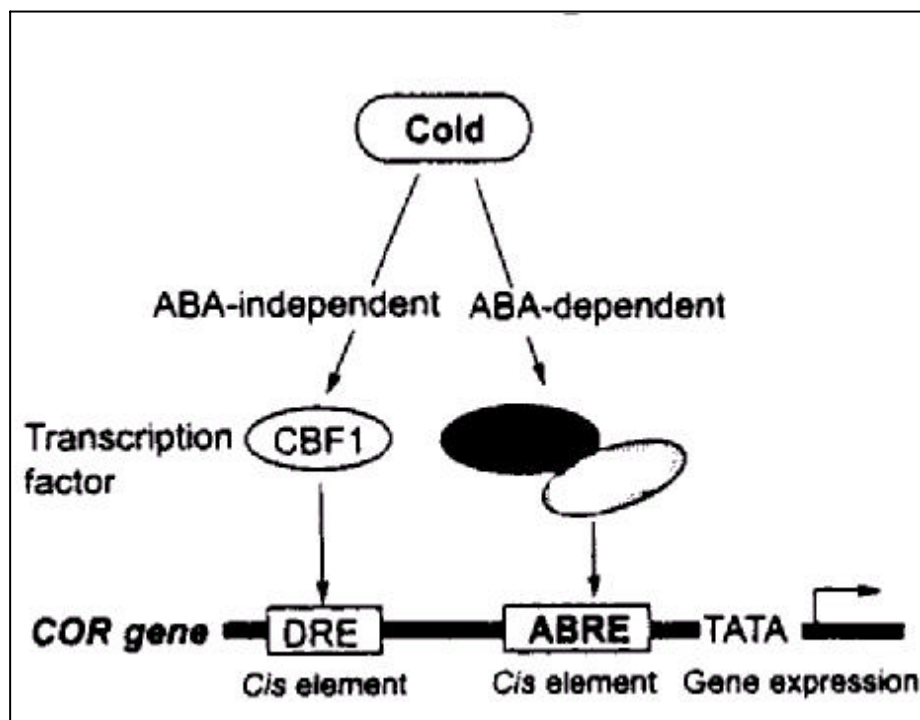


Figure 5b : Voies dépendantes et voies indépendantes de l' Acide Abscissique (ABA)

D - Techniques d'analyse de promoteur

Différentes techniques permettent d'étudier le promoteur d'un gène. Dans ce dernier chapitre, nous allons faire un bref descriptif des principales d'entre-elles et évoquer leurs avantages et inconvénients.

1. Etude des interactions ADN-protéines

1.1. Le footprinting

Le principe fondamental du footprinting repose sur la protection de l'ADN par les protéines de liaison à l'ADN. Lors de la liaison, la protéine protège cette région d'interaction de la dégradation causée par des enzymes (DNase I ou exonuléase) ou par des agents chimiques (dont le DMS). La zone d'interaction est mise en évidence par le footprinting proprement dit (fig 6). Il est obtenu suite à la dégradation enzymatique ou chimique du fragment étudié. La détection des fragments issus de la dégradation est possible car le fragment d'ADN étudié est marqué à son extrémité.

Les analyses par footprinting nécessitent idéalement la purification des protéines nucléaires car c'est là que se trouvent les protéines se liant à l'ADN. D'autre part, le fragment d'ADN sur lequel les analyses se portent doit également être isolé. Il sera par la même occasion marqué à l'une de ses extrémités (selon la technique envisagée). Les fragments sont marqués en 5' avec une T4 kinase, ou en 3' en utilisant une Klenow, une T4 polymérase ou une terminale transférase. La T4 kinase transfère du ^{32}P à l'extrémité 5' de l'ADN. C'est une réaction d'échange dans laquelle le phosphate terminal non marqué est transféré de l'ADN sur l'ADP; l'ADN déphosphorylé est rephosphorylé avec le ^{32}P . Dans le cas de la Klenow, un seul dNTP marqué radioactivement intervient : il est choisi selon l'extrémité 5' protrudante du fragment ciblé. Lors du remplissage, l'extrémité est marquée. La T4 polymérase, quant à elle, a une activité exonucléase. Elle supprime l'extrémité 3' protrudante, et en ajoutant le nucléotide marqué, produit une extrémité à un bout franc [66].

Les protéines purifiées sont ensuite mises en présence de l'ADN marqué. Enfin, une étape de digestion permet de localiser et d'identifier une zone d'ADN reconnue par des protéines. C'est par cette dernière étape que diffèrent les techniques de footprinting.

a) Digestion à la DNase I

La DNase I est une protéine de 40 Å de diamètre (30.4 MDa) se liant dans le petit sillon de l'ADN et coupant au niveau des liaisons phosphodiester. Son imposante taille l'empêche de couper l'ADN sous et autour d'une protéine liant l'ADN.

L'ADN incubé en présence de protéines nucléaires est soumis à une digestion partielle par la DNase I. Des fragments de différentes tailles sont générés. Le résultat de la digestion est analysé par électrophorèse et par autoradiographie ; il permet d'identifier la région protégée. Un "gap" est présent dans le profil de migration lorsque l'ADN a été protégé par une protéine de liaison. Pour localiser le footprinting, l'ADN libre restreint comigre (dans des pistes séparées) avec l'ADN digéré en présence de protéine de liaison (fig 6).

Pour chaque brin d'ADN étudié, des mises au point s'imposent. La concentration en DNase I à utiliser et le temps pour que la digestion par l'enzyme soit partielle doivent être optimisés. Ces paramètres sont fonction de la quantité et de la pureté de la fraction protéique ajoutée. En règle générale, plus il y a de protéines, plus il faut utiliser de DNase I.

De plus, cette technique requiert un excès de protéines pour visualiser, après digestion partielle, la zone protégée. Tous les fragments d'ADN doivent interagir avec les protéines pour que le footprinting soit visible. Le footprinting implique plus de matériel génomique et protéique qu'il n'en faudrait pour un gel retard. Elle demande aussi un excès d'ADN compétitif non-spécifique qui lie les protéines de liaison à l'ADN non-spécifiques. De plus, la DNase I ne coupe pas sans discrimination : certaines séquences sont très rapidement attaquées, alors que d'autres ne sont pas touchées même après une digestion de longue durée. Enfin, la DNase I ne permet pas une étude précise du site de fixation. Cette grosse molécule ne coupe pas au niveau de l'ADN libre situé immédiatement à proximité de la zone reconnue car il y a encombrement stérique avec la protéine fixée. La région identifiée par le footprinting est donc plus grande que le site de fixation réel de la protéine sur l'ADN.

D'autres techniques de footprinting existent mais l'avantage de la technique à la DNase I est la taille de l'agent coupant. En effet, lors d'encombrement stérique protégeant l'ADN de la dégradation, c'est l'action de la DNase I qui est bloquée en premier : elle ne sait pas venir se fixer pour cliver l'ADN, par opposition aux agents chimiques qui, par leur petite taille, ont encore parfois la possibilité de passer et d'agir même en présence de protéine liée. C'est donc avec la DNase I que les interactions ADN-protéines sont le mieux détectées [67-69].

b) Digestion à l'exonucléase III

L'exonucléase III comme la DNase I, agit spécifiquement sur l'ADN. C'est une enzyme monomérique de 28 MDa. Elle a plusieurs activités : exonucléase 3'-5', phosphatase 3', endonucléase AP et RNase H. Dans le cas qui nous occupe, c'est l'activité exonucléase qui est considérée. Elle enlève les nucléotides des deux brins, à partir de l'extrémité 3'. L'ADN libre, non fixé par des protéines, est complètement digéré. Par contre l'ADN lié par une protéine est protégé de la dégradation, de même que le fragment qui le suit en 5'. La liaison à une protéine spécifique conserve l'ADNs. La longueur de cet ADN est déterminée par électrophorèse sur gel de séquençage en utilisant un standard de longueur d'ADN approprié. La détection sur un seul

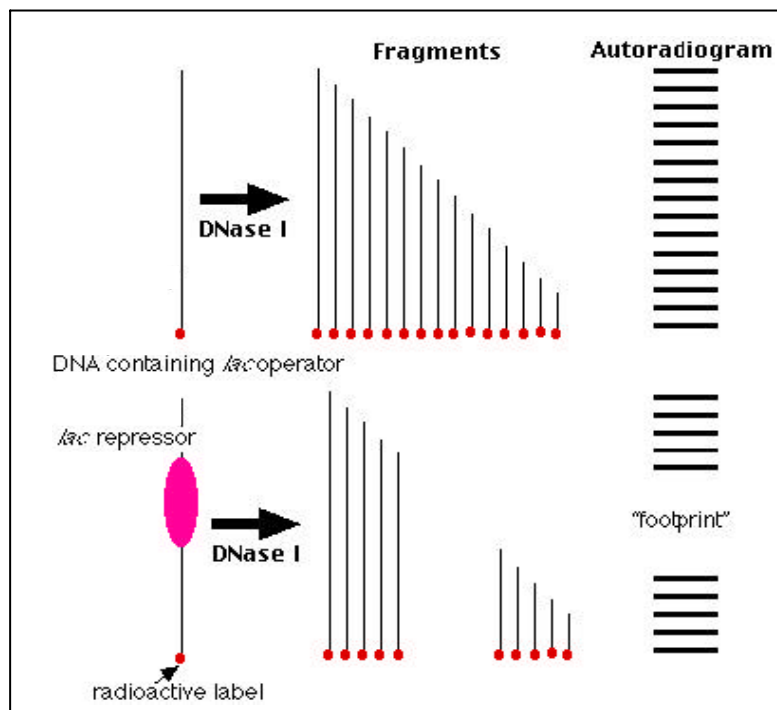


Figure 6 : Schéma du principe du footprinting à la DNase I .

La partie supérieure du schéma montre le résultat de l'action de la DNase I sur de l'ADN non reconnu par des protéines

La partie inférieure montre le résultat de l'action de la DNase I sur de l'ADN protégé localement par une protéine. L'autoradiogramme révèle un "gap" dans le profil de migration.

brin d'une zone reconnue est possible en enlevant de manière spécifique, par l'action d'une enzyme de restriction, le marquage de l'autre brin (fig. 7).

Quoi qu'il en soit, le point fort de cette technique est l'absence de bruit de fond : l'ADN non reconnu est complètement dégradé [68]. Ce n'est pas le cas lors de l'utilisation de la DNase I où les fragments non reconnus et clivés interfèrent avec le footprinting. Le seul inconvénient, pour que la technique à l'ExoIII soit efficace, est la durée de vie du complexe ADN-protéine qui doit être supérieure au temps mis par l'exonucléase pour l'atteindre.

c) DMS

Les techniques chimiques pour le footprinting sont principalement des techniques utilisant le DMS (Diméthyl Sulfate). Son avantage est qu'il réagit rapidement avec l'ADN. Il méthyle l' N_7 de la guanine et l' N_3 de l'adénine, respectivement dans le grand et dans le petit sillon. Les interactions protéiques sont mises en évidence par des modifications de réactivité du DMS (méthylation protection - l'ADN interagit d'abord avec les protéines) ou en sélectionnant des protéines de liaisons (méthylation interférence - l'ADN interagit d'abord avec le DMS). Après la réaction, l'ADN libre est séparé des complexes ADN-protéine par gel retard. Les deux types d'ADN sont récupérés et sont comparés sur gel de séquençage. L'analyse complète nécessite l'examen des deux brins.

L'action des agents chimiques n'est cependant pas toujours empêchée par la présence de protéines. Leur action est donc moins spécifique que dans le cas des nucléases. De plus, il arrive qu'ils réagissent avec les protéines [69].

1.2. Les désavantages du footprinting [67-70]

La clarté du footprint dépend fortement de la longueur de la zone de liaison. Pour que l'empreinte soit nette, il faut que toutes les molécules d'ADN soient impliquées dans l'interaction. C'est pour cela qu'il est rare que les résultats obtenus soient satisfaisants lorsque la concentration ou le degré de purification des protéines de liaison ne sont pas suffisants ! En effet, un excès d'ADN par rapport aux protéines de liaison ne permettra pas de visualiser de "gap". Il y aura toujours une partie de l'ADN encore libre qui sera clivé au niveau de la zone reconnue.

Un dernier point pouvant poser quelques ambiguïtés lors d'analyse par footprinting est la présence de sites résistants à l'action des endonucléases. Il est alors difficile de faire la différence entre la présence de ces sites récalcitrants et la présence de sites reconnus par des protéines de liaison à l'ADN.

Dès lors, pour confirmer les résultats obtenus, le footprinting doit être couplé avec le gel retard (EMSA)

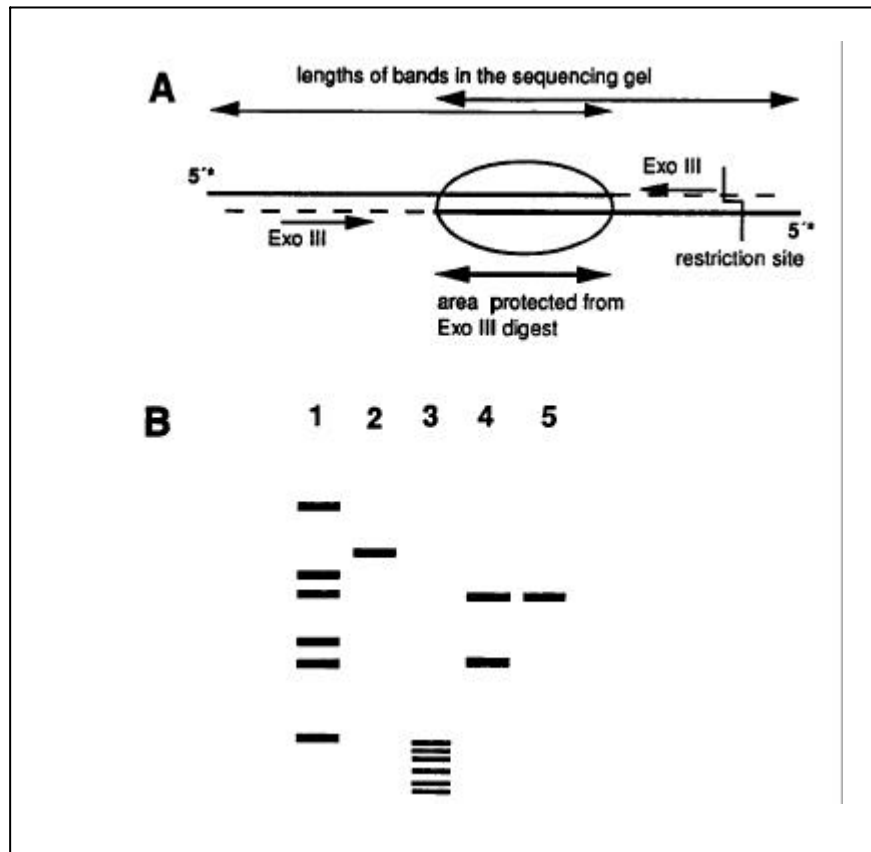


Figure 7 : Représentation schématique du principe du footprinting à l'exonucléase III
Le point B montre le footprinting obtenu après l'action de l'Exo III en présence du complexe montré en A.

- piste 1 : le marqueur de poids moléculaire
- piste 2 : Fragment d'ADN marqué
- piste 3 : Fragment d'ADN marqué, après traitement à l'exo III
- piste 4 : profil du complexe ADN-protéine, obtenu après traitement Exo III avec les deux extrémités 5' marquées
- piste 5 : profil du complexe ADN-protéine obtenu après traitement Exo III. Un des marquage est enlevé avec une enzyme de restriction (voir schéma A)

1.3. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Dans la technique du gel retard, les protéines de liaison sont incubées en présence de fragments d'ADN synthétiques recouvrant le potentiel site de liaison révélé par le footprinting. Ces fragments peuvent être modifiés à souhait au niveau de leur taille et de leur séquence afin de connaître avec précision les nucléotides impliqués dans l'interaction ADN-protéine. Les complexes ADN-protéine sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non-dénaturant ou sur gel d'agarose. Les fragments d'ADN libres migrent plus rapidement vers l'anode que les fragments liés par les protéines spécifiques qui sont retardés. Des protéines de liaisons, différentes par leur masse ou leur charge, modifient différemment la mobilité électrophorétique et donc la migration.

L'utilisation du gel retard après le footprinting permet d'augmenter la précision de l'analyse du fragment d'ADN. Le footprinting, utilisé en complémentarité de l'EMSA, détectera des régions reconnues par des protéines de petite taille n'amenant pas de modification de profil de migration (en présence d'ADN) sur gel retard [70].

2. Utilisation de gènes rapporteurs

Les gènes rapporteurs sont des gènes dont l'expression indique le fonctionnement du promoteur sous le contrôle duquel ils sont placés. En général, leur expression est facilement détectable.

Les principaux gènes rapporteur sont la β -glucuronidase (GUS), la chloramphénicol acétyltransférase (*cat*) et la luciférase ou encore la Green Fluorescent Protein (GFP). Lorsqu'un de ces gènes est utilisé, il faut bien évidemment veiller à ce qu'il ne soit pas endogène de l'organisme dans lequel il est introduit [16].

Le gène de la luciférase a été isolé d'une luciole; il code pour une enzyme qui catalyse la production de lumière par oxydation ATP-dépendante de luciférine. Le niveau de lumière produit par la luciférine étant très faible, son utilisation nécessite l'acquisition d'un luminomètre coûteux.

Le gène *cat* est un rapporteur sensible utilisé dans plusieurs organismes et il y a peu d'interférence dans les tissus végétaux. L'inconvénient réside cependant en une inhibition possible de l'enzyme dans certaine plante

La GFP (Green Fluorescent Protein) est une protéine qui provient d'une méduse et qui a la propriété d'être fluorescente : elle émet de la lumière verte lorsqu'elle est exposée aux UV. Elle est intéressante, car contrairement à d'autres rapporteurs, elle ne nécessite pas de substrat externe. Qui plus est, la détection peut se faire *in vivo* avec un équipement de détection simple [71].

Et enfin, le gène GUS qui est le rapporteur le plus souvent utilisé. Il code pour une hydrolase acide qui catalyse la clivage d'un grand nombre de β -glucuronides. En général, son substrat est soluble dans l'eau et pourra entrer dans les cellules. Parmi ces substrats, il en existe pour la spectrophotométrie, pour la fluorométrie, et pour les analyses histologiques. Les analyses

histologiques sont intéressantes pour localiser le lieu d'expression d'un gène. Le substrat utilisé en histochimie est le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-glc). Ce substrat peu coloré est hydrolysé par la β -glucuronidase et libère un dérivé indolyl qui forme un colorant indigo qui précipite. Les tests GUS sont très sensibles et, avec le même rapporteur, des données qualitatives et quantitatives peuvent être obtenues en utilisant des substrats différents. Chez les plantes, l'activité endogène qui pourrait être présente se distingue généralement de l'activité GUS introduite.

L'insertion d'un fragment de promoteur en amont d'un gène rapporteur aboutit à la production d'ARNm si le promoteur est fonctionnel. L'ARNm sera traduit si la phase de lecture n'a pas été modifiée. Des délétions progressives du promoteur placées en amont du gène rapporteurs peuvent ainsi être testées afin de trouver approximativement les régions contenant des sites indispensables pour la transcription. Si le promoteur contient toujours les éléments minimum nécessaire à l'activation de la transcription, le gène rapporteur sera fonctionnel.

Cette approche demande un grand nombre de manipulations avant de pouvoir observer les premiers résultats. Il faut non seulement obtenir la construction d'intérêt mais il faut pouvoir l'étudier dans un contexte physiologique adéquat. Bien que l'expression transitoire en protoplaste puisse être utilisée, on privilégie grandement l'intégration stable du gène d'intérêt dans le génome de la plante et la production de plantes transgéniques. La régénération de plantes transgéniques, leur analyse minutieuse et, enfin, l'étude de l'activité d'un promoteur dans différents contextes physiologiques constituent un travail de longue haleine.

Les techniques d'analyse de promoteur ne se suffisent pas à elles-mêmes. Les résultats provenant de l'utilisation de gènes rapporteurs peuvent être confirmés et affinés par le footprinting et l'EMSA. Inversement, un site de liaison détecté en footprinting et/ou en EMSA pourra être testé en présence d'un rapporteur.

Chapitre 2 : Objectifs du mémoire

L'étude réalisée au cours de ce mémoire s'inscrit dans le cadre général de l'allocation du carbone chez les végétaux, et plus particulièrement dans l'étude des variations du degré de polymérisation (DP) de l'inuline au cours de la saison chez la chicorée industrielle. Les propriétés agro-alimentaires de l'inuline sont en effet étroitement liées à leur DP : il existe un intérêt industriel marqué pour une inuline de haut DP pouvant faire à la fois office de fibre ou être hydrolysée pour produire des fragments de faible DP à haut pouvoir sucrant.

Le DP de l'inuline varie au cours de la saison et en particulier chute brutalement suite à un stress au froid. Cette variation peut s'expliquer par deux processus distincts, mais complémentaires : une augmentation de l'activité de dégradation et/ou une diminution de l'activité de synthèse. L'étude des enzymes de dégradation (invertases, FEH, inulinases) a déjà fait l'objet d'un mémoire et est en cours d'étude à l'heure actuelle au laboratoire. Il s'imposait donc d'entreprendre l'étude de la régulation des voies de biosynthèse de l'inuline au cours de la saison. Les deux gènes impliqués dans la synthèse de l'inuline chez la chicorée ont été clonés au laboratoire il y a plusieurs années. Il s'agit des gènes de la SST (sucrose-sucrose fructosyle transférase) et de la FFT (fructane : fructane fructosyle transférase). La SST est la première enzyme intervenant dans la synthèse de l'inuline : elle produit de l'isokestose au départ de deux saccharose. La FFT est l'enzyme responsable de l'élongation de l'inuline par ajout de fructoses sur l'isokestose et les chaînes de DP supérieur. Ces deux gènes ont servi de point de départ à notre travail.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à l'étude de la variation des niveaux des transcrits des gènes SST et FFT au cours de la saison. Les gènes qui manifestent une expression dépendante du froid font l'objet d'une étude approfondie.

Une seconde partie du travail est consacrée à l'isolement du promoteur de ce(s) gène(s) présentant une réponse au froid. L'activité de ce(s) promoteur(s), et de versions tronquées de celui-ci(ceux-ci), a été évaluée au moyen du gène rapporteur GUS dans des plantes de tabac et de chicorée obtenues après transformation par *Agrobacterium tumefaciens*.

Chapitre 3 : Matériel et Méthode

A - Techniques concernant les acides nucléiques

1. Extraction d'ADN génomique végétal

Matériel

- Nucleospin plant: méthode CTAB (Macherey Nagel)

Ce protocole utilise en combinaison l'extraction au CTAB ainsi qu'une fixation ultérieure sur une membrane de silice. Le CTAB (cetyl trimethyl ammonium bromide) est un détergent capable d'éliminer les polysaccharides et autres contaminants tout en gardant l'ADN en solution. Le lysat obtenu est ensuite mélangé au tampon C4 afin d'ajuster les conditions de fixation de l'ADN de la membrane de silice. Le passage sur colonne permet l'élimination des contaminants par lavage avec les tampons CW et C5. L'ADN génomique est ensuite élué avec un tampon à faible concentration en sel: le tampon CE. Aucune composition de tampon n'est disponible dans le manuel fourni avec le kit.

- ?? Effectuer le broyage des feuilles par la méthode à l'azote liquide
- ?? Transférer le broyat (max. 100 mg) dans un tube et ajouter 400 µl de tampon C1
- ?? Remettre l'ensemble en suspension et incubé 30 minutes à 37°C
- ?? Centrifuger pendant 5 min à vitesse maximale pour culotter les débris cellulaire
- ?? Transférer le surnageant dans un nouveau tube
- ?? Réaliser une extraction PCI
- ?? Récupérer la phase aqueuse et ajouter 300 µl de tampon C4 ainsi que 200 µl d'éthanol
- ?? Bien homogénéiser en mélangeant par inversion
- ?? Insérer une colonne de filtration Nucleospin sur un tube collecteur et charger l'échantillon
- ?? Centrifuger 1 min à 10000 g et éliminer l'éluat
- ?? Mettre 400 µl de tampon CW dans la colonne
- ?? Centrifuger 1 min 10000 g et éliminer l'éluat
- ?? Mettre 700 µl de tampon C5 sur dans colonne Nucléospin
- ?? Centrifuger 1 min à 10000 g et éliminer l'éluat
- ?? Mettre 200 µl de tampon C5 dans la colonne et centrifuger 2 min à vitesse maximale
- ?? Transférer la colonne Nucléospin dans un tube Eppendorf propre
- ?? Placer 100 µl de tampon d'éluion CE préalablement chauffé à 70°C
- ?? Incuber 5 min
- ?? Centrifuger 1 min à vitesse maximale pour récupérer l'ADN.

2. Genome Walker (GW)

Matériel

- Universal Genome Walker kit (Clontech)
- Enzymes de restriction et tampons, SspI et HpaI (Gibco)
- H₂O désionisée
- Phénol

- Chloroforme
- Ethanol 95 % froid
- Ethanol 80 % froid
- NaOAc 3M (ph 4.5)
- TE_{10/0.1}, pH 7.5

REM : schéma de synthèse des différentes étapes (fig 8).




2.2. Vérification de la qualité de l'ADN génomique par restriction

Pour que cette manipulation fonctionne correctement, il est indispensable de vérifier au préalable la qualité de l'ADNg utilisé. Ce renseignement sera donné par une digestion enzymatique par DraI. Un ADN génomique de bonne qualité se caractérise par un profil en trainée, indiquant que l'ADN a été digéré en de nombreux sites par l'enzyme de restriction.

- ?? Dans un tube PCR, réaliser le mix suivant : 5 µl d'ADNg
1.6 µl enzyme DraI (10 U/µl)
2 µl tampon pour DraI 10X
11.4 µl H₂O désionisée
- ?? Mélanger avec précaution
- ?? Incuber une nuit à 37°C
- ?? Faire migrer 5 µl de la réaction sur un gel d'agarose 1 % contenant du BET (0.5 µg/ml).

2.3. Digestion de l'ADN génomique avant amplification

Trois digestions sont réalisées sur l'ADNg. Les enzymes de restriction utilisées sont DraI (du kit), SspI et HpaI (Gibco). Ces enzymes génèrent toutes trois des bouts francs :

| DraI | SspI | HpaI |
|---|---|---|
|  GTT AAC CAA TTG |  TTT AAA AAA TTT |  AAT ATT TTA TAA |

- ?? Réaliser les mélanges suivants :
2.5 µg d'ADNg
3.2 µl d'enzyme de restriction (10 U/µl)
4 µl de tampon correspondant à l'enzyme de restriction
Porter à 40 µl avec de l'H₂O désionisée
- ?? Incuber 2 heures à 37°C
- ?? Vortexer brièvement et lentement. Remettre à 37°C pour la nuit
- ?? Pour chaque réaction, faire migrer 2 µl sur un gel d'agarose 1% pour vérifier les restrictions. Continuer avec les tubes dont la digestion a été complète.

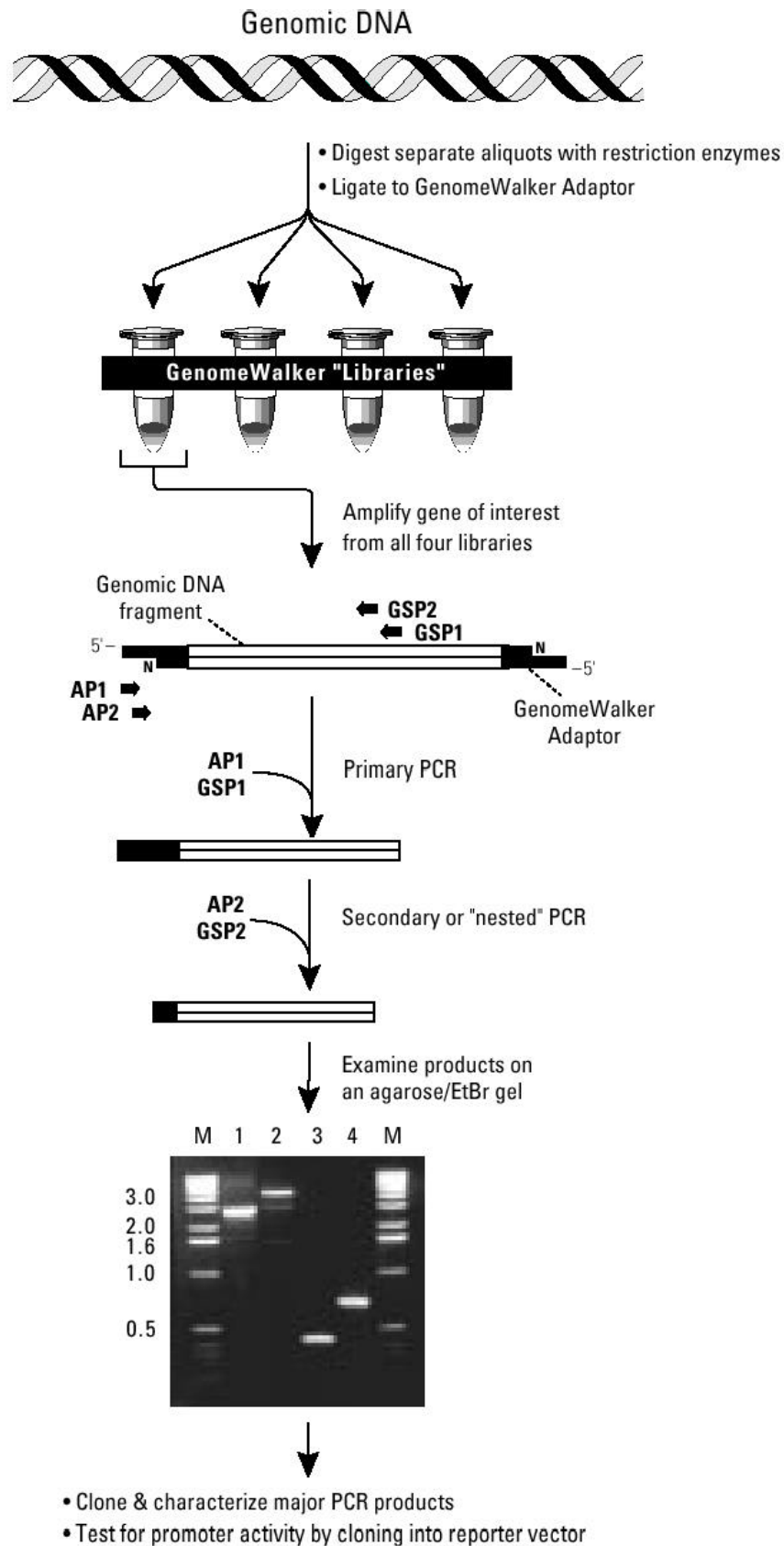


Figure 8 : Représentation schématique des différentes étapes Genome Walker (Clontech)

2.4. Purification de l'ADN génomique restreint

- ?? Pour chaque tube, porter le volume à 100 µl en ajoutant de l'eau désionisée
- ?? Ajouter 1 volume de phénol. Vortexer à vitesse lente 10 s et centrifuger brièvement pour séparer la phase aqueuse de la phase organique. Récupérer la phase aqueuse dans un nouveau tube
- ?? Ajouter 1 volume de chloroforme
- ?? Vortexer lentement 10 s et centrifuger brièvement pour séparer les deux phases. Récupérer la phase supérieure (aqueuse) dans un nouveau tube
- ?? Ajouter 2 volumes d'éthanol 95 % froid et 1/10 volume de NaOAc 3 M (pH 4.5)
- ?? Vortexer à faible vitesse 10 s
- ?? Centrifuger à 13000 *g* pendant 10 min
- ?? Eliminer le surnageant et laver le culot avec 100 µl d'éthanol 80 % froid
- ?? Centrifuger à 13000 *g* pendant 5 min
- ?? Eliminer le surnageant et laisser sécher le culot à l'air libre
- ?? Resuspendre le culot dans 20 µl de TE_{10/0.1} (pH 7.5)
- ?? Vortexer 10 s à faible vitesse
- ?? Faire migrer 1 µl de chaque tube sur gel d'agarose 1 % pour vérifier la pureté de l'ADNg restreint.

2.5. Ligation des adaptateurs GW

- ?? Déposer 4 µl de l'ADN restreint et purifié dans un nouveau tube
- ?? Ajouter :
 - 1.9 µl adaptateur GW (25 µM)
 - 1.6 µl de tampon de ligation 10X
 - 0.5 µl ligase T4 (6 U/µl)
- ?? Incuber une nuit à 16°C
- ?? Stopper la réaction en incubant 5 min à 70°C
- ?? Ajouter 72 µl de TE_{10/1} (pH 7.5) à chaque tube
- ?? Vortexer 10 s à faible vitesse.

2.6. Amplification

Cette étape est réalisée en deux parties. Elle nécessite la réalisation de PCR imbriquées à l'aide de deux paires d'amorces.

Une PCR primaire est réalisée au moyen d'une amorce externe localisée sur l'adaptateur (AP1) et d'une seconde positionnée dans le gène (GSP1). Lors de la PCR secondaire, l'amplification se déroule au départ d'amorces internes (AP2 et GSP2) par rapport à celles utilisées dans la PCR primaire. Les amorces interne (GSP2) et externe (GSP1) sont déterminées en aval du promoteur recherché, dans le gène de séquence connue.

| | |
|-----|---------------------------------------|
| AP1 | GTA-ATA-CGA-CTC- ACT-ATA-GGG-C |
| AP2 | ACT-ATA-GGG-CAC -GCG-TGG-T |

a) PCR primaire

?? Pour chaque tube :

14.92 µl H₂O

2 µl Tampon 1 10X pour Expand (17.5 mM MgCl₂) (Roche)

0.4 µl AP1 (Adaptator Primer 1) (10 µM)

1 µl GSP1 (10 pmole)

0.4 µl dNTP (10 mM)

0.28 µl Expand (3U/µl), (Roche)

?? Programme PCR utilisé : GwPCR1

| Température (°C) | Temps | Nombre de cycles |
|------------------|---------------|------------------|
| 94 | 10 min | |
| 94 72 | 25 s 3 min | 7 |
| 94 67 | 25 s 3 min | 32 |
| 67 | 10 min | 1 |
| 4 | 8 | 1 |

b) PCR secondaire

?? Pour chaque tube :

10.92 µl H₂O

2 µl tampon 1 10X pour Expand

0.4 µl AP2 (Adaptator Primer 2)

0.4 µl dNTP 10 mM

1 µl GSP2

5 µl produit PCR primaire dilué 50x

0.28 µl Expand

?? Programme PCR utilisé : GwPCR2

| Température (°C) | Temps | Nombre de cycles |
|------------------|---------------|------------------|
| 94 | 10 min | 1 |
| 94 72 | 25 s 3 min | 5 |
| 94 67 | 25 s 3 min | 20 |
| 67 | 7 min | 1 |
| 4 | 8 | 1 |

c) Electrophorèse

Faire migrer en parallèle les 2 produits d'amplifications sur gel d'agarose 1%, TAE 1X contenant du BET (0.5 µg/ml). Pour la PCR1, faire migrer 10 µl de produit d'amplification et pour la PCR2, faire migrer les 20 µl sur une seule piste.

Si, lors de la seconde PCR, le décalage attendu apparaît, les fragments d'intérêt peuvent être extraits du gel et être conservés à -20°C avant de passer à l'étape de clonage.

3. Amplification de fragments d'ADN par PCR

3.1. Composition de milieu réactionnel

- x µl d'ADN ou d'ADNc
- 1 µl amorce gauche (10 ou 100 pmole)
- 1 µl amorce droite (10 ou 100 pmole)
- 5 µl de tampon concentré 10X, correspondant à l'enzyme utilisée
- 2 U de polymérase (Taq, 5 U/µl, Roche)
- Porter à 50 µl avec de l'eau stérile désionisée

3.2. Appareils utilisés

Appareils PCR : Mini cycler MJ Research (Biozym)
PTC-100 Programmable thermal controller (Biozym)
Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer)

3.3. Programme type utilisé

| RTSST | | | |
|---------------------|------------------|-------------|-------------------|
| Etapas | Température (°C) | Temps (min) | Nombre deCycle(s) |
| Dénaturation longue | 94 | 10 | 1 |
| Dénaturation | 94 | 1 | 45 |
| Hybridation | 55 | 1 | |
| Elongation | 72 | 1 | |
| Elongation longue | 72 | 10 | 1 |
| Conservation | 4 | | |

4. Electrophorèse sur gel

L'électrophorèse sur gel sépare les fragments d'ADN en fonction de leur taille. La vitesse de migration des fragments est inversement proportionnelle à la taille de l'amplicon et du pourcentage en agarose du gel utilisé lors de la migration. La taille des amplicons est estimée en faisant co-migrer des fragments d'ADN de taille connue. Le marqueur de poids moléculaire utilisé ici est le Smart Ladder (Eurogentec)

4.1. Gel d'agarose

Solutions :

- pour 200 ml d'EDTA 0.5M, pH 8.0 : 46.53 g EDTA
150 ml H₂O
Mettre à pH 8.0 avec NaOH
Mettre à volume
Autoclaver
- pour 1 l tampon TAE 50X : 242 g Tris base
57.1 ml acide acétique glacial
100 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0
Autoclaver

Les concentrations en agarose les plus fréquemment utilisées sont 1 % et 0.8 %, préparées dans du tampon TAE 1X.

Les cuves d'électrophorèse utilisées sont les suivantes :

- Pharmacia LKB GNA 100 (gels de 50 ml)
- Mini Sub Cell GT (Biorad) (gels de 35 ml)

Protocole

- ?? Porter la solution d'agarose 1 % à ébullition (micro-onde) pour obtenir une solution homogène et limpide
- ?? Verser la quantité de gel nécessaire dans un tubeposable avec jupe de 50 ml (Falcon). Lorsque la solution a atteint une t° de 60°C, ajouter 2 µl de bromure d'éthidium (BET) (2 mg/ml). Couler le gel, placer les peignes adéquats et laisser gélifier de 20 à 30 min
- ?? Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X. Enlever les peignes. Charger les puits avec les échantillons lestés de bleu de chargement (rapport 1/5). L'intensité du courant est adaptée en fonction de la cuve utilisée (Biorad : 50 mV, Pharmacia : 90 mV)
- ?? Visualiser les acides nucléiques sous UV au transilluminateur (? = 302 nm).

4.2. Gel d'agarose haute résolution

Solutions utilisées

- Nusieve® GTG® agarose (BMA - BioWhittaker Molecular Applications)
- tampon TBE 10 x, pour 1 L : 108 g Tris base
55 g acide borique
100 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0

Protocole

- ?? Choisir un récipient dont le volume est 2 à 4 fois supérieur à celui de la solution
- ?? Ajouter le tampon d'électrophorèse froid et un barreau magnétique pour l'agitation
- ?? Incorporer doucement l'agarose en poudre pendant que la solution est vigoureusement agitée
- ?? Peser le récipient et la solution avant de chauffer
- ?? Couvrir le récipient de parafilm percé d'un petit trou pour la ventilation
- ?? Sur une plaque chauffante, amener la solution, toujours agitée, à ébullition
- ?? Maintenir une faible ébullition jusqu'à ce que l'agarose soit dissout
- ?? Ajouter la quantité d'eau désionisée chaude nécessaire pour retrouver le poids de départ

- ?? Mélanger et ajouter 2 µl de BET (2 mg/ml)
- ?? Lorsque la solution atteint 60°C, couler le gel. Placer les peignes adéquats. Laisser gélifier de 20 à 30 min
- ?? Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du tampon TAE 1X. Enlever les peignes. Charger les puits avec les échantillons lestés de bleu de chargement (rapport 1/5). L'intensité du courant est adaptée en fonction de la cuve utilisée
- ?? Visualiser les acides nucléiques sous UV au transilluminateur (? = 302 nm).

4.3. Gel de polyacrylamide

Solutions et matériel

| Gels polyacrylamide pour ADN (25 ml = 2 gels) | | | | |
|---|----------|----------|---------|----------|
| | 6 % | 8 % | 10 % | 12 % |
| H ₂ O | 17.39 ml | 15.730ml | 14.1 ml | 12.25 ml |
| Acrylamide 30 %/Bisacrylamide Solution 37.5:1 (Biorad) | 5 ml | 6.66 ml | 8.3 ml | 5 ml |
| TBE 10 x | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml | 2.5 ml |
| APS 10 % | 100 µl | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl | 10 µl | 10 µl |

Les cuves d'électrophorèse utilisées sont du type Mini-Protean II (Biorad)

Protocole

- ?? Réaliser le montage nécessaire pour le coulage du gel
- ?? Préparer la solution d'acrylamide selon la concentration désirée. Homogénéiser après l'ajout de l'APS et du TEMED
- ?? Couler le gel, placer le peigne et laisser polymériser. Placer le gel dans une cuve d'électrophorèse contenant du TBE 1X
- ?? Charger les puits avec les échantillons lestés de bleu de chargement (rapport 1/1)
- ?? Faire migrer les échantillons sous tension constante de 75 volts pendant une durée adéquate
- ?? Après migration, démouler et incuber le gel pendant 40 min dans une solution TBE 1X contenant 0.5 µg/ml de BET
- ?? Visualiser les acides nucléiques sous UV au transilluminateur, (? = 302 nm)

5. Purification d'acides nucléiques

5.1. Purification de fragments d'amplification

Matériel

- Amicon ® Microcon® Centrifugal Filter Device - YM100 (MILLIPORE)
- Centrifugeuses de table : Biofuge A et Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)

Protocole

- ?? Pour chaque échantillon, préparer une colonne de purification

- ?? Adapter cette colonne sur un des tubes collecteurs fournis
- ?? Ajouter 200 µl d'H₂O au produit PCR (volume total maximum: 500 µl) ; déposer l'ensemble sur la colonne. Répéter une fois l'opération
- ?? Centrifuger à 4500 g pendant 15 min
- ?? Retourner la colonne sur un nouveau tube collecteur
- ?? Déposer 20 µl d'H₂O sur la membrane de la colonne (sans la toucher) et attendre 1 min
- ?? Centrifuger à 1500 g pendant 15 min
- ?? Stocker l'éluat à -20°C.

5.2. Extraction d'ADN d'un gel d'agarose

a) Méthode QIAEX II

Matériel

- Tampon TE 10 mM : 10 mM Tris HCl et 1 mM EDTA pH 8.0
- Kit : QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen)
- centrifugeuse de table : Biofuge A et Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)

Protocole

- ?? Faire migrer les échantillons sur gel d'agarose 1 %, TAE 1X contenant 0.5 µg/ml de BET, dans une cuve préalablement rincée par du TAE 1X et contenant du tampon fraîchement préparé
- ?? Prélever les bandes d'ADN d'intérêt à l'aide d'une lame de scalpel stérile en veillant à minimiser le temps d'exposition aux UV
- ?? Ajouter le volume de tampon QX1 adéquat en fonction de la taille du fragment à purifier

| | |
|-------------------------------|--|
| fragments ADN <100 bp | Ajouter 6 volumes de tampon QX1 |
| fragments ADN 100 bp – 4 kb | Ajouter 3 volumes de tampon QX1 |
| fragments ADN >4 kb | Ajouter 3 volumes de tampon QX1 plus 2 volumes d'H ₂ O |
| >2 % ou Metaphor agarose gels | Ajouter 6 volumes de tampon QX1 |

- ?? Vortexer 30 s la résine QIAEX II. Ajouter cette solution à l'échantillon selon la quantité d'ADN

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| < 2 µg ADN | Ajouter 10 µl de QIAEX II |
| 2–10 µg ADN | Ajouter 30 µl de QIAEX II |
| Pour 10 µg ADN suppl. | 30 µl de QIAEX II |

- ?? Incuber 10 min à 50°C pour solubiliser l'agarose ; toutes les 2 min, mélanger les tubes par inversion pour garder la résine QIAEX en solution. La couleur du tampon doit rester jaune (contrôle de pH)
- ?? Centrifuger à 10000 g pendant 30 s et éliminer le surnageant
- ?? Laver le culot avec 500 µl de tampon QX1 et resuspendre par inversion. Centrifuger 30 s et ôter le surnageant
- ?? Laver avec 500 µl de tampon PE. Resuspendre le culot et centrifuger 30 s. Enlever le surnageant qui contient les sels contaminants et recommencer une fois l'opération.
- ?? Laisser sécher la résine 10 à 15 min à température ambiante
- ?? Resuspendre la résine dans 20 µl de TE 10 mM et incuber dans les conditions données dans le tableau ci-dessous

| | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| DNA fragments =4 kb | Incuber à t° ambiante pendant 5 min |
| DNA fragments 4–10 kb | Incuber à 50°C pendant 5 min |
| DNA fragments >10 kb | Incuber à 50°C pendant 10 min |

?? Centrifuger à 10000 *g* pendant 30 s. Récupérer le surnageant dans un nouveau tube

b) Méthode Millipore

Matériel

- Kit : Ultrafree-DA Centrifugal Filter Device (Millipore-Amicon)
- Centrifugeuse de table : Biofuge A et Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)

Méthode

- ?? Faire migrer les échantillons sur gel d'agarose 1 %, TAE 1X contenant 0.5 µg/ml de BET, dans une cuve préalablement rincée par du TAE 1X et contenant du tampon fraîchement préparé
- ?? Prélever les bandes d'ADN d'intérêt à l'aide d'une lame de scalpel stérile en veillant à minimiser le temps d'exposition aux UV
- ?? Placer la bande d'intérêt dans la colonne
- ?? Broyer le gel au moyen d'un tips, et centrifuger 10 min à 5500 *g* à température ambiante
- ?? Filtrer l'éluat sur Microcon afin de le concentrer et de changer le tampon (resuspendre dans du TE_{10/0.1} ou dans de l'eau)

5.3. Purification Phénol-Chloroforme

Matériel et solutions

- Centrifugeuse de table : Biofuge A et Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)
- Centrifugeuse sous vide : VR-1 (Heto Lab Equipment)
- NaCl 1M
- Phénol-Chloroforme-Isoamylique (PCI) (25:24:1)
- Ethanol absolu (-20°C)

Méthode

- ?? Porter le volume dans lequel se trouve le produit à purifier à 300 µl
- ?? Ajouter 1/2 volume de NaCl 1M, pour obtenir une concentration en NaCl de 0.33M
- ?? Mélanger plusieurs fois par inversion
- ?? Ajouter 1 volume de PCI et agiter vigoureusement
- ?? Centrifuger pendant 5 min à 12000 *g*
- ?? Récupérer la phase aqueuse (phase supérieure), sans toucher l'interface
- ?? Précipiter l'ADN avec 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C). Incuber 1 heure à -20°C
- ?? Laisser 1 heure à -20°C
- ?? Centrifuger 20 min à 12000 *g* et éliminer le surnageant
- ?? Sécher l'ADN à température ambiante pendant 20 min (ou 5 min dans la centrifugeuse sous vide)
- ?? Resuspendre dans du TE_{10/0.1} ou dans de l'eau

6. RT-PCR semi-quantitative

6.1. Synthèse d'ADNc au départ d'ARN total

Matériel

- First strand cDNA synthesis kit (Amersham-Pharmacia Biotech)
- enzyme : Mo-MLV (Moloney murine leukemia virus)

b) Préparation de l'ARN total

- ?? Dans un tube Eppendorf, mettre 10 µl d'ARN total de concentration connue
- ?? Dans un bain-marie à 65°C, incuber les tubes 10 min pour dénaturer cet ARN. Refroidir immédiatement sur glace.

c) Préparation des tubes de réaction

- ?? Pour un volume réactionnel de 15 µl, chaque tube doit contenir :

| | |
|---|------|
| Bulk First Strand Reaction Mix | 5 µl |
| Primer d(T)18 (0.2 µg/ml) | 1 µl |
| DTT (200 mM) | 1 µl |
| 2.5 µg ARN (+ H ₂ O RNAase free) | 8 µl |
- ?? Regrouper l'ensemble des réactifs dans le fond du tube par une courte centrifugation
- ?? Incuber 1 h à 37°C
- ?? Conserver l'ADNc SS à -80°C.

7. Dosage au spectrophotomètre

Les acides nucléiques absorbent les UV à une longueur d'onde de 260 nm. Une unité de densité optique (DO) correspond à une concentration connue en ARN (ou en ADN).

En fonction de ce qui est mesuré, 1 DO correspond à environ 50 µg/µl d'ADNds, à 40 µg/µl d'ADNss ou d'ARN, ou encore à 20 µg/µl d'oligonucléotides simple brin

- ?? Régler le zéro du spectrophotomètre en utilisant 1 ml de la solution utilisée pour la remise en suspension des acides nucléiques dans une cuvette réduite en quartz
- ?? Diluer 1 µl d'acides nucléiques à doser. Mélanger par inversion
- ?? Mesurer l'absorbance de l'échantillon à 260 et à 280 nm. La mesure à 280 nm dose la présence de protéines contaminantes

Le rapport des absorbances 260/280 permet de vérifier la pureté de l'échantillon. Une purification correcte donne des rapports compris entre 1.6 et 2. Des valeurs inférieures indiquent la présence de phénol ou de protéines contaminantes.

8. Quantification des acides nucléiques dans un gel d'agarose

Les acides nucléiques présents dans un gel d'agarose sont visualisés aux UV grâce au bromure d'éthidium. Une estimation de la quantité de matériel peut être effectuée par comparaison au Smart Ladder (Eurogentec), marqueur de poids moléculaire quantitatif (fig. 9). De plus, après une séparation sur gel d'agarose, une quantification de la fluorescence émise par le bromure d'éthidium, proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques, peut être réalisée par le logiciel Fluor S-max Quantity One (Biorad).

9. Le clonage

9.1. Ligation

a) Ligation dans pCRII

Matériel

- TA cloning Kit-Dual promoter (Invitrogen)

Protocole

- ?? Quantifier sur gel d'agarose les échantillons par spectrophotométrie ou par comparaison au Smart Ladder
- ?? Mélange réactionnel utilisé pour la ligation
 - 1 µl de tampon ligase T4 10X
 - X µl de vecteur pCR II
 - Y µl d'insert
 - 1 µl d'enzyme ligase T4
 - Porter à 10 µl avec de l'eau

} Rapport insert/vecteur = 3
- ?? Incuber une nuit à 14°C.

b) Ligation dans pBI121

Matériel

- Vecteur pBI121
- Ligase T4 et tampon (Gibco)

Protocole

- ?? Quantifier les échantillons sur gel d'agarose par spectrophotométrie ou par comparaison au Smart Ladder
- ?? Mélange réactionnel utilisé pour la ligation
 - 2 µl de tampon ligase T4 5X
 - X µl de vecteur pBI121
 - Y µl d'insert
 - 1 µl d'enzyme ligase T4 (5U/µl)
 - Porter à 10 µl avec de l'eau

} Rapport insert/vecteur = 3
- ?? Incuber une nuit à 14°C.

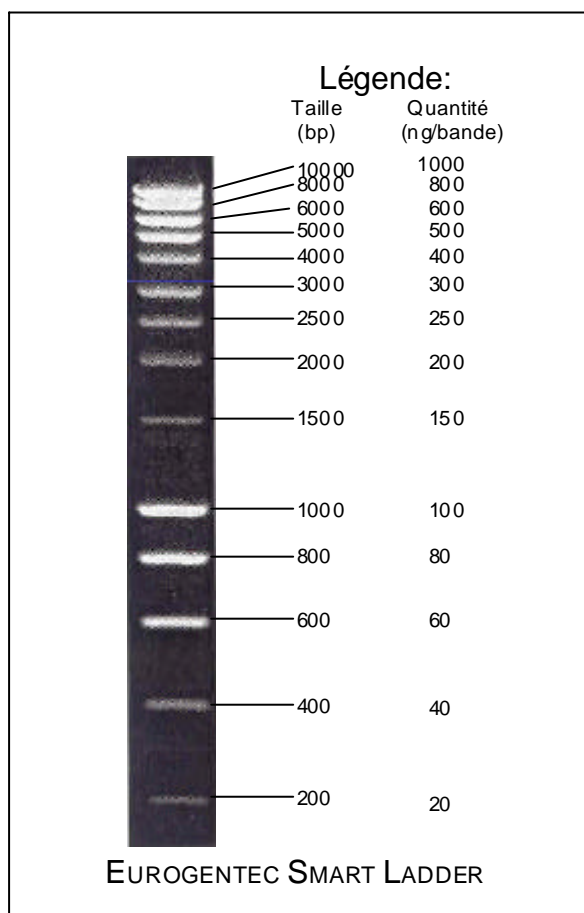


Figure 9 :, Smart Ladder (Eurogentec)

Marqueur de poids moléculaire quantitatif (valeurs données pour 5 µl)

9.2. Milieux de culture bactérienne

Milieux de culture :

LB-Agar : pour 1 l, 10 g de bactotryptone
 10 g de NaCl
 5 g d'extrait de levure
 15 g d'agarose
Mettre à volume avec de l'H₂O
Ajuster à pH 7.5 avec NaOH
Autoclaver puis maintenir à 55°C pour ajouter les antibiotiques

TB : pour 1 l, 12 g de bactotryptone
 24 g d'extrait de levure
 4 ml de glycérol
Ajouter 900 ml d'H₂O
D'autre part, dissoudre 2.3 g de KH₂PO₄
12.5 g de K₂HPO₄
Porter à 100 ml en ajoutant de l'H₂O
Autoclaver les deux solutions
Refroidir à température ambiante
Mélanger les 2 solutions en conditions stériles

Antibiotiques utilisés

| Produit | Stock | Stockage | Concentration finale |
|---------------|-----------------------------|----------|----------------------|
| Ampicilline | 50 mg/ml H ₂ O | -20°C | 60 µg/ml |
| Tétracycline | 5 mg/ml H ₂ O | -20°C | 50 µg/ml |
| Kanamycine | 10 mg/ml H ₂ O | -20°C | 50 µg/ml |
| Gentamicine | 10 mg/ml | 20-25°C | 20 µg/ml |
| Rifampicine | 25 mg/ml méthanol (ou DMSO) | -20°C | 10 µg/ml |
| Streptomycine | 25 mg/ml H ₂ O | -20°C | 25 µg/ml |

Test blanc/bleu

| Produit | Stock | Stockage | Concentration finale |
|---------|------------------------------|----------|----------------------|
| IPTG | 20 mg/ml H ₂ O | -20°C | 70 µg/ml |
| X-Gal | 20 mg/ml N-diméthylformamide | -20°C | 70 µg/ml |

9.3. Transformation d'*E. coli*

a) Transformation par choc thermique

Matériel

- SOC (Eurogentec) : 2 % de bactotryptone, 0.5 % d'extrait de levure, 10 mM NaCl,
- 2.5 Mm KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ et 20 mM glucose
- Souches utilisées : (*E. coli* thermocompétentes) TOP10F' (Eurogentec)

Protocole

- ?? Prendre un tube de bactéries (50 µl) pour chaque transformation. Ajouter 3 µl de produit de ligation. Mélanger délicatement et incubé 30 min sur glace
- ?? Choc thermique à 42°C pendant 30 s
- ?? Remettre sur glace pendant 2 min
- ?? Ajouter 250 µl de SOC aux bactéries transformées et incubé 1 h à 37°C
- ?? Étaler les bactéries sur milieu LB contenant IPTG, X-gal et les antibiotiques adéquats
- ?? Incuber une nuit à 37°C
- ?? Cribler les colonies blanches par PCR au moyen d'amorces adéquates.

b) Transformation par électroporation

Matériel

- Electroporateur Bio Rad Gene Pulser Unit (Biorad)
- Chambres d'électroporation 0.2 cm (Biorad)
- Milieu SOC : A 97 ml d'eau, ajouter 2 g bactotryptone, 0.55 g extrait de levure, 1 ml NaCl et 1 ml KCl. Mélanger et autoclaver. Amener à 55°C et ajouter 1 ml 2 M Mg²⁺ filtré (1 M MgCl₂, 1 M Mg SO₄)
- cellules électrocompétentes DH10B (Gibco BRL)

Protocole

- ?? Pour chaque transformation à réaliser, placer une chambre d'électroporation sur glace
- ?? Dégeler les bactéries DH10B sur glace
- ?? Déposer 40 µl de bactéries dans la chambre d'électroporation et y ajouter le produit de ligation (maximum 100 ng)
- ?? Electroporer les bactéries à 2.5 kV, 25 µF et 100 ?
- ?? Ajouter immédiatement 1 ml de SOC et incubé 1 heure dans un bain à 37° C
- ?? Étaler les bactéries sur milieu LB avec les antibiotiques adéquats
- ?? Incuber 1 nuit à 37°C
- ?? Cribler les colonies par PCR au moyen d'amorces adéquates.

c) Stock glycérol

Matériel

- Milieu de culture liquide (LB ou TB)
- Antibiotiques de sélection
- Glycérol 20%
- Filtre 0.22 µm (Millex ® - Millipore)
- Centrifugeuse BHG Hermle ZK 364

Protocole

- ?? Inoculer 5 ml de milieu de culture, contenant les antibiotiques de sélection, avec le clone d'intérêt. Incuber une nuit à 37°C sous agitation
- ?? Centrifuger la culture de bactéries 5 min à 3000 g à 4°C
- ?? Éliminer le surnageant
- ?? Resuspendre le culot bactérien dans 1 ml de glycérol 20% stérilisé par filtration (0.22 µm)
- ?? Stocker les bactéries à -80°C.

10. Préparation d'ADN plasmidique

10.1. Mini préparation d'ADN plasmidique

Matériel

- Milieu LB et antibiotiques
- Solution GTE : 50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0).
Autoclaver et conserver à 4°C
- Solution SDS-NaOH : 0.2 N NaOH (fraîchement dilué d'un stock 10 N) et 1% SDS
Pour 3 ml de solution, 60 µl NaOH 10 N et 300 µl SDS 10%
- Solution KAc: 60 ml acetate de potassium 5 M, 11.5 ml d'acide acétique glacial et
28.5 ml eau
- Phénol-Chloroforme-Isoamylique (PCI) (25:24:1)
- Tampon TE : Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0
- Ethanol 96 %
- Ethanol 70 % (froid)
- TE-ARNase, sans ADNase : tampon TE contenant 20 µg/ml de ARNase sans ADNase
- Centrifugeuse de table : BiofugeA et Biofuge 13 (Heraeus Sepatech)
- Centrifugeuse sous-vide : VR-1 (Heto Lab Equipment)

Protocole

- ?? Dans un tube Falcon de 50 ml,ensemencer 15 ml de milieu LB liquide contenant les antibiotiques adéquats avec la souche bactérienne d'intérêt. Incuber une nuit à 37°C sous agitation (250 rpm)
- ?? Transférer 1.5 ml de culture dans un Eppendorf. Centrifuger à 12000 g pendant 3 min à 4°C
- ?? Enlever tout le surnageant et mettre le culot en suspension dans 100 µl de GTE froide. Vortexer vigoureusement et s'assurer que le culot est complètement remis en suspension
- ?? Ajouter 200 µl de solution SDS-NaOH fraîchement préparée. Mélanger plusieurs fois par inversion. NE PAS VORTEXER. Stocker les tubes sur glace
- ?? Ajouter 150 µl de solution KAc. Mélanger plusieurs fois par inversion et garder les tubes sur glace pendant 5 min
- ?? Centrifuger à 12000 g pendant 5 min à 4°C et transférer le surnageant dans un nouveau tube.
- ?? Ajouter un volume de PCI (+/- 400 µl). Vortexer et centrifuger à 12000 g pendant 5 min à température ambiante
- ?? Récolter le surnageant (la phase aqueuse). Précipiter l'ADN plasmidique avec 2 volumes d'éthanol 96 % (+/- 700 µl) à température ambiante. Vortexer et laisser 2 min à température ambiante
- ?? Centrifuger à 12000 g pendant 5 min à 4°C. Enlever le surnageant. Laver le culot avec 1 ml d'éthanol 70 % et centrifuger à 12000 g pendant 5 min à 4°C
- ?? Enlever l'éthanol et sécher le culot à la centrifugeuse sous-vide pendant 5 min
- ?? Resuspendre le culot dans 30 µl de tampon TE-ARNase. Incuber 1 h à 37°C. Vortexer, centrifuger et stocker à -20°C.

10.2. Midi et maxi préparations d'ADN plasmidique

Matériel

- Kit Qiagen-tip 100 (Qiagen) Ki Qiagen-tip 500

- tampon P1 : Dissoudre 6.06 g Tris base, 3.72 g Na₂EDTA 2H₂O dans 800 ml d'H₂O. Ajuster le pH à 8.0 avec HCl. Ajuster ensuite le volume à 1 litre, avec de l'H₂O. Ajouter 100 mg de RNAses A par litre de P1
- tampon P2 : Dissoudre 8.0 g de NaOH dans 950 ml d'H₂O et 50 ml de solution SDS 20%, pour un volume final de 1 litre
- tampon P3 : Dissoudre 294.5 g d'acetate de potassium dans 500 ml d'H₂O. Ajuster le pH à 5.5 avec (+/- 110 ml) de l'acide acétique glacial. Ajuster le volume avec de l'eau à 1 litre
- tampon QBT : Dissoudre 43.83 g de NaCl, 10.46 g de MOPS dans 800 ml d'H₂O. Ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH. Ajouter 150 ml d'isopropanol pur et 15 ml de solution triton X-100 10%. Ajuster le volume avec de l'eau à 1 litre
- tampon QC : Dissoudre 58.44 g de NaCl et 10.46 g de MOPS dans 800 ml d'H₂O et ajuster le pH à 7.0 avec NaOH. Ajouter 150 ml d'isopropanol pur. Ajuster le volume avec de l'eau à 1 litre
- tampon QF : Dissoudre 73.05 g de NaCl et 6.06 g de tris base dans 800 ml d'H₂O et ajuster le pH à 8.5 avec l'HCl. Ajouter 150 ml d'isopropanol pur et ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau
- Isopropanol (température ambiante)
- Ethanol 70% (température ambiante)
- milieu TB
- Centrifugeuse Beckman J2-21

Protocole

Volumes maximum de culture recommandés :

| | midi-préparation | maxi-préparation |
|---------------------|------------------|------------------|
| Plasmides High-Copy | 25 ml | 100 ml |
| Plasmides Low-Copy | 100 ml | 500 ml |

- ?? Inoculer une culture de départ de 2-5 ml de milieu LB (ou TB pour Low-Copy) contenant les antibiotiques de sélection. Incuber environ 8 h à 37°C sous agitation, (250 rpm)
- ?? Diluer la culture de départ (1/500 à 1/100) dans 25, 100 ou 500 ml de milieu LB ou TB selon le tableau ci-dessus. Incuber pendant 12-16 h à 37°C, sous agitation (250 rpm)
- ?? Centrifuger les bactéries à 6000 g pendant 15 min à 4°C
- ?? Resuspendre le culot de bactéries dans 4 ml (10 ml pour maxi-prep) de tampon P1
- ?? Ajouter 4 ml (10 ml) de tampon P2, mélanger doucement par inversion. Incuber 5 min à température ambiante
- ?? Ajouter 4 ml (10 ml) de tampon P3 refroidi, mélanger immédiatement mais doucement par inversion; incubé 15 min (20 min) sur glace
- ?? Centrifuger 30 min à 20000 g à 4°C. Récupérer le surnageant contenant l'ADN plasmidique dans un nouveau tube
- ?? Re-centrifuger le surnageant 15 min à 20000 g à 4°C.
- ?? Sur une colonne QIAGEN-tip100 (QIAGEN-tip 500) faire passer 4 ml (10 ml) de tampon d'équilibration QBT
- ?? Faire pénétrer le surnageant provenant de la seconde centrifugation dans la résine
- ?? Laver la résine avec 2 x 10 ml (2 x 30 ml) de tampon QC
- ?? Eluer l'ADN avec 5 ml (15 ml) de tampon QF
- ?? Précipiter l'ADN de l'éluat en ajoutant 0.7 volume, 3.5 ml (10.5 ml) d'isopropanol à température ambiante. Mélanger et centrifuger immédiatement à 15000 g pendant 30 min à 4°C. Enlever prudemment le surnageant
- ?? Laver le culot d'ADN avec 2 ml (5 ml) d'éthanol 70 % à température ambiante; centrifuger à 15000 g pendant 10 min à 4°C. Oter le surnageant avec précautions sans décrocher le culot
- ?? Laisser sécher le culot à l'air libre et resuspendre l'ADN dans du tampon (TE pH 8.0 ou Tris HCl 10 mM, pH 8.5).

11. Séquençage

Le séquençage est réalisé avec le kit "ABI PRISM BigDye Sequencing Terminator", commercialisé par la firme ABI PRISM. Le séquençage proprement dit est réalisé au moyen du séquenceur automatique ABI PRISM 377 DNA Sequencer de Perkin-Elmer.

La quantité d'ADN recommandée pour la réaction de pré-séquençage varie en fonction de la taille du fragment à séquencer.

| Matrice | Quantité |
|--------------|-------------|
| 100-200 bp | 1 – 3 ng |
| 200-500 bp | 3 – 10 ng |
| 500-1000 bp | 5 – 20 ng |
| 1000-2000 bp | 10 – 40 ng |
| > 2000 bp | 40 – 100 ng |

- ?? Estimer la concentration des fragments d'ADN en comparant l'intensité de la bande obtenue avec le marqueur de poids moléculaire quantitatif (Smart Ladder – Eurogentec).
- ?? Prélever la quantité adéquate d'ADN (voir tableau ci-dessus), ajouter 7.2 pmole d'amorce et porter à 12 µl avec de l'eau désionisée
- ?? Déposer l'échantillon à séquencer au laboratoire responsable du séquenceur automatique.

B - Techniques de biologie végétale

1. Culture in vitro

1.1. Stérilisation d'akènes de chicorée

Solutions et matériel

- Ethanol 80 % + tween-20 0.1 %
- Eau de Javel 30 % + tween-20 0.1 %
- Eau stérile
- Tubes Falcon, pinces, boîtes pétri

Protocole

- ?? Sous hotte à flux laminaire, placer les akènes à stériliser dans un tube Falcon de 50 ml. Ajouter 20 ml de solution éthanol-tween. Mélanger pendant 10 min, par inversion, de manière à maintenir les akènes en contact avec la solution
- ?? Laisser sédimenter les akènes dans le fond du tube et éliminer l'éthanol. Ajouter 20 ml de solution eau de Javel-Tween et mélanger encore pendant 25 min
- ?? Laisser sédimenter les akènes et éliminer l'eau de Javel. Ajouter 20 ml d'eau stérile et mélanger pendant 10 min. Recommencer 2 fois l'opération
- ?? Les akènes sont stériles.

1.2. Germination des akènes stérilisés

Matériel

- Milieu MS : dissoudre 4.7 g de sels de Murashige et Skoog (M 0222-Duchefa) dans 1 L d'H₂O. Ajuster à pH 5.8 et autoclaver.
- Boîtes stériles (12 cm x 7 cm x 8 cm) de Culture In vitro (CIV)

Protocole

- ?? Le milieu est coulé dans des boîtes de culture dès qu'il est manipulable à la main. Laisser gélifier avant de fermer les boîtes.
- ?? Les akènes stérilisés sont déposés sur le milieu de culture et maintenues dans une chambre de culture illuminée et maintenue à 25°C.

1.3. Multiplication végétative des plantes transformées

Matériel

- Milieu de régénération: pour 1 litre,
 - 4.708 g de sels de Murashige et Skoog (Duchefa)
 - 0.2 mg acide naphthalène acétique (NAA)
 - 2 mg de benzylaminopurine (BAP)
 - 30 g de saccharose
 - 8 g d'agarose
 - Ajuster le pH à 5.8
 - Autoclaver

- MS/2 : pour 1 litre, 2.354 g de sels de Muraschige et Skoog (pH 5.8) (M 0222-Duchefa).
- Acide naphthalène acétique 3 g/l (NAA)
- Benzylaminopurine 2 g/l (BAP)
- Kanamycine 10 mg/ml (utilisation 0.05 mg/ml)
- Carbenicilline 50 mg/ml (utilisation 0.3 mg/ml)
- Boîtes de Pétri stériles (? 14 cm)
- Boîtes de CIV stériles (12 cm x 7 cm x 8 cm)
- Tubes de CIV stérilisés

Protocole

- ?? Préparer des boîtes et des tubes contenant du milieu de régénération supplémenté en kanamycine et en carbénicilline
- ?? Transférer les cals obtenus après transformation dans des boîtes de Pétri où ils peuvent continuer à se développer
- ?? Transférer les plantules issues de la transformation dans des boîtes de CIV contenant du MS/2 supplémenté en antibiotiques et en BAP (20 mg/l) pour favoriser le développement des feuilles
- ?? Préparer également du MS/2 supplémenté en antibiotiques et du MS/2 contenant les agents de sélection ainsi que du BAP (20 mg/l) pour les plantules à isoler en tube, afin de favoriser la pousse des feuilles.

2. Transformation de plantes par *A. tumefaciens*

2.1. Préparation de cellules électrocompétentes

Matériel

- Milieu LB
- Antibiotiques : streptomycine, rifampicine, gentamycine
- Eau stérile froide
- Glycérol 10 % froid
- *Agrobacterium tumefaciens*, souche LBA4404 pBR9MCS5 virGN54 D

Protocole

- ?? Préculture : dans un tube Falcon de 50 ml inoculer 5 ml de milieu LB liquide contenant les antibiotiques de sélection : streptomycine (25 µg/ml), rifampicine (10 µg/ml), gentamycine (20 µg/ml). Incuber 24 h à 27°C sous forte agitation
- ?? Ensemencer 1 litre de milieu LB liquide contenant les mêmes antibiotiques par la préculture. Incuber une nuit à 27°C sous forte agitation
- ?? Arrêter la culture lorsque la DO à 600 nm est comprise entre 0.5 et 1.0
- ?? Répartir 4 x 200 ml de culture dans des "biberons" stériles de 250 ml
- ?? Centrifuger à 3000 g pendant 10 min 4°C
- ?? Eliminer le surnageant et rincer chaque culot avec 100 ml d'eau stérile froide (4°C); resuspendre les cellules en chambre froide
- ?? Centrifuger à nouveau à 3000 g pendant 10 min à 4°C; recommencer 2 fois le rinçage
- ?? Resuspendre les culots dans un volume final de 20 ml de glycérol 10 % froid
- ?? Transvaser la suspension finale dans un tube Falcon de 50 ml et centrifuger 10 min à 3000 g à 4°C
- ?? Eliminer le surnageant et resuspendre le culot de cellules dans 2 ml de glycérol 10 % froid
- ?? Aliquoter par 100 µl et stocker les bactéries électrocompétentes à -80°C jusqu'à utilisation.

2.2. Electroporation d'*A. tumefaciens*

Matériel

- Cellules électrocompétentes *Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 pBR9MCS5 **virGN54 D**
- Electroporateur Gene Pulser Unit (Biorad)
- Chambres d'électroporation 0.2 cm (Biorad)
- Milieu SOC
- Boîtes LB agar + antibiotiques de sélection

Protocole

- ?? Placer 100 µl de cellules électrocompétentes dans la chambre d'électroporation
- ?? Ajouter 1 µg de plasmide
- ?? Mélanger et placer les cuvettes sur glace pendant 1 min
- ?? Electroporer les bactéries à 2.5 kV, 25 µF et 100 ?
- ?? Ajouter immédiatement 1 ml de SOC
- ?? Incuber les cellules à 28°C pendant 1 h
- ?? Etaler 100 µl de bactéries sur milieu sélectif : LB agar, streptomycine, gentamycine, rifampicine et antibiotique pour la sélection du plasmide. Incuber pendant 2 à 3 jours à 28°C.

2.3. Transformation d'explants foliaires

Matériel

- Eau désionisée stérile
- Filtre stérile
- Milieu de régénération : pour 1 litre, 4.708 g de sels de Muraschige et Skoog, 0.2 mg acide naphtalène acétique (NAA), 2 mg de benzylaminopurine (BAP), 30 g de saccharose et agarose 0.8 %. Ajuster le pH à 5.8 et autoclaver
- Kanamycine (solution stock à 10 mg/ml)
- Carbenicilline (solution stock à 50 mg/ml)

Protocole

- ?? Préparer une culture liquide d'*Agrobacterium* (10-20 ml) dans du milieu LB sélectif sous forte agitation (250 rpm) à 28°C pendant une nuit
- ?? Diluer 10x la suspension bactérienne obtenue dans de l'eau désionisée stérile
- ?? Prélever stérilement les feuilles à transformer. Blesser chacune d'elles en la coupant légèrement en plusieurs endroits au moyen d'un scalpel muni d'une lame neuve
- ?? Placer la suspension de bactéries dans une boîte de Petri (+/- 100 ml), ainsi que les morceaux de feuilles. Veiller à ce que chaque explant foliaire soit bien imprégné (5 min)
- ?? Transférer les explants sur un filtre stérile et placer un second filtre stérile par dessus pour éliminer l'excédent de solution.
- ?? Transférer les explants sur des boîtes de Petri contenant le milieu de régénération, sans antibiotique. Placer les explants face supérieure (la plus verte) contre l' agarose
- ?? Fermer les boîtes avec du parafilm et les incuber à 25°C à l'obscurité (boîte recouverte de papier aluminium) pendant 2 à 3 jours
- ?? Après 3 jours, transférer les explants foliaires sur le milieu de régénération supplémenté de carbenicilline (0.3 mg/ml) et de kanamycine (0.1 mg/ml)

- ?? Refermer les boîtes de Petri avec du parafilm et les replacer dans la chambre de culture à 25°C pendant minimum 1 mois
- ?? Après 3-4 semaines, vérifier la présence de cals et/ou de pousses vertes sur les explants traités
- ?? Lorsque les plantules ont une taille suffisante (0.5 à 1 cm), les transférer dans des boîtes de culture contenant le milieu MS supplémenté de kanamycine (0.05 mg/ml) et de carbenicilline (0.3 mg/ml).

3. Mise en évidence de l'activité glucuronidase (GUS)

matériel

solution de coloration:

| Solution stock | Concentration finale | µl/ml |
|--|----------------------|-------------|
| 1,0 M Na ₂ HPO ₄ | 0,1 M | 100 |
| 0,25 M EDTA | 10 mM | 40 |
| 5 mM Kferricyanide | 0,5 mM | 100 |
| 5 mM Kferrocyanide | 0,5 mM | 100 |
| 10% Triton X-100 | 0,1 % | 10 |
| 10mM X-Glucuronide | 1,0 mM | 100 |
| H ₂ O | | 550 |
| Volume final | | 1000 |

REM : Le X-gluc est préparé dans du DMSO (diméthylsulfoxyde), aliquoté par 100µl et stocké à -20°C pendant maximum 6 mois

protocole

- ?? Prélever stérilement une plantule
- ?? Prélever, au moyen d'une lame neuve : une petite feuille
des fragments d'épiderme de feuilles
quelques pointes de racines
quelques coupes transversales de la tige

Coloration des tissus

- ?? Rapidement, placer les explants dans un eppendorf contenant 900 µl de solution de coloration et 100 µl de solution X-gluc (10X concentrée)
- ?? Placer les eppendorfs ouverts dans une cloche à vide pendant 2 minutes après évacuation de l'air (infiltration des réactifs sous vide dans les différents tissus étudiés)
- ?? Placer les eppendorfs fermés à 37°C jusqu'au lendemain
- ?? Observation des tissus, localisation des cellules exprimant l'activité glucuronidase
- ?? Prélever les différents explants et les monter entre lames et lamelles (prendre la solution de coloration ou de l'eau comme milieu de montage)
- ?? Observer les différents échantillons au microscope (fond clair et contraste de phase) et prendre des photos des zones intéressantes

Chapitre 4 : Résultats et discussions

A - Evolution du taux d'ARNm des FFT et SST

Les amplifications réalisées pour évaluer les variations des ARNm codant pour les enzymes étudiées l'ont été sur des ADNc produits au départ d'ARN totaux extraits de racines de chicorée industrielle, (*Cichorium intybus* var. *sativum* cultivar Polanowicka), issue de la descendance par autofécondation du plant 97 TM17-03 de la S.A. Warcoing. Quatorze échantillons ont été prélevés en champs entre le 27 juillet 1999 et le 25 janvier 2000, répartis comme suit :

| Prélèvement | Date | Prélèvement | Date |
|-------------|----------|-------------|----------|
| 01 | 27.07.99 | 08 | 02.11.99 |
| 02 | 10.08.99 | 09 | 16.11.99 |
| 03 | 24.08.99 | 10 | 30.11.99 |
| 04 | 07.09.99 | 11 | 14.12.99 |
| 05 | 21.09.99 | 12 | 28.12.99 |
| 06 | 05.10.99 | 13 | 11.01.00 |
| 07 | 19.10.99 | 14 | 25.01.00 |

Le 13 novembre, les racines de chicorée ont subi pour la première fois des températures inférieure à 0°C. La période suivant cette date est représentée dans le tableau par la partie grisée.

1. Transcription reverse (RT)

L'ADNc utilisé pour l'ensemble des manipulations provient d'une synthèse d'ADNc-ss unique obtenue par transcription reverse à partir d'ARN totaux extraits des racines de chicorée et conservés au laboratoire, dans le cadre de l'étude de l'implication des invertases dans la dégradation de l'inuline.

Les concentrations en ADNc des 14 échantillons sont les suivantes :

| Echantillon | Concentration (µg/µl) | Echantillon | Concentration (µg/µl) |
|-------------|--------------------------|-------------|--------------------------|
| 01 | 1.51 | 08 | 0.83 |
| 02 | 1.08 | 09 | 0.95 |
| 03 | 1.86 | 10 | 1.97 |
| 04 | 1.33 | 11 | 1.14 |
| 05 | 3.26 | 12 | 1.92 |
| 06 | 1.29 | 13 | 1.76 |
| 07 | 1.24 | 14 | 1.55 |

2. Choix des amorces

Deux paires d'amorces ont été déterminées sur base des séquences connues d'ADNc de chicorée pour la SST et pour la FFT.

GCGTAGTAGAGAGACCACCCACATGGCTTCCTCTACCAACGCGCCACCAACCCCTCTCATCCTCCGTGATGA
 GACTCAAATCTGCCACAACCTAGCCGGATCTCCGGTGGGTCCGGCTTTATCCATGGCCAATGTCCTTTCC
 GGGATCCTCGTTTCTGCTCTGTCTATCTGTGTTCTGGTTGCTGTTATCCACGACCAATCACAACAAATAA
 TGGCGACCAACAACCATCAGGGAGGAGATAAAACCCACCTCCGCGCCACGTTTACAGCTCCGTTGCTACA
 AGTTGATCTCAAACGGGTTCCCGAAAGTTGGAATCCAATGCTGATGTTGAGTGGCAACGCTCAGCTTAC
 CATTTTCAACCCGATAAGAATTTTCATCAGCGATCCTGATGGTCCAATGTATCACATGGGGTGGTACCATC
 TCTTCTACCAATACAACCCAGAATCAGCCATATGGGGCAACATCACATGGGGCCACTCCGTATCACGAGA
 CATGATCAACTGGTTCATCTCCCATTCGCCATGGTCCCGGACCATTGGTACGACATCGAAGGGGTATG
 ACCGGATCCGCCACAGTACTCCCCAACGGTCAGATCATCATGCTCTACACTGGCAACGCGTACGATCTCT
 CCCAGTTACAGTGTCTAGCATACGCGCTCAACTCATCTGATCCTCTCCTTCTGGAATGGAAGGATGAGA
 AGGAAACCCAAATTTGTGCCACCCCTGGTGTGGGATACAAAGATTTTCGAGATCCATCCACATTTATGG
 ATGGTCTCGATGGGGAATGGAGAATGGTAATGGGTCCAAACACAATGAACTATTGGTTGTGCAATGG
 TCTACCGTACTACTAATTTTACGCAATTTGAACTGAACGAGGAGGTATCCACGCGAGTCCCCATACTGG
 TATGTGGGAATGTGTGGACCTATACCTGTGTCCACCACGCACACGAATGGGTGGACATGAAGGATAAT
 GGGCCGAATGTTAAATATATTTTGAACAAAGTGGAGACGAAGACCGACATGATTGGTATGCGGTTGGAA
 CTTTGTACCCGTGAGAAAGATAAGTGGTACCTGACGACCCCTGAAACGATGTGGGAATCGGGTTGAGATA
 CGACTACGGAAGGTTCTATGCGTCAAAGACATTTTATGACCAACATCAAAAGCGGAGGGTACTTTGGGGT
 TATGTTGGTGAACCGACCCCTTAAGTCCGATCTTTTAAAGGGATGGGCTAACATCTTGAATATCCCAA
 GGTCCGTTGTTTGTGACACGCAAAACCGGAACCAATTTGATTCAATGGCCGATTGAAGAAGTAGAAAAATT
 GAGATCAACAAATTTATGACGAATTTCAAAGACGTGGAGCTCCGACCCGATCACTCGTTCCCTCGAAATT
 GGCACAGCGACACAGTTGGACATAAGTGCACATTTGAAATCGATCAAAAGAAGTTACAATCAACGCTTG
 AAGCCGATGTTTGTCTCACTGTACAATAGCGAGGGTTGAGTCGGGAGGGGTGTGTTGGGACCATTTGG
 AATCGTGGTCTTACGGGATGCCAACCGCTCTGAGCAACTTCTGTGTATTTCTATATTTGCAAAAGACACC
 GATGGAACCTCAAAACTTACTTCTGTGCTGATGAATCAAGGTATCGACGCAAAAGACGTGGAAAAAT
 GGGTATACGGAGAGAGTGTCTGTCTTGGAGGTGAAATTAACAATGAGGTTACTGTTGGATCATCTC
 GATAGTGAAGGGTTGCGCAAGGAGGAAGAACGGTGGTACATCAAGAGTGTACCCACGAGGCCATC
 TATGGCGCTGTCTAAGATATTTTGTTCACAACGCCACCGGAATTAGCGTCAAGGTATCTCTCAAGATCT
 GGAATATGGCGGAAGCACAACTCGATCCATTCCTCTTTCTGGTGGAGTTCTTGATTATTAGAATTCGT
 CATCCCTCTCTATTGTTGTGTTATTTGTTGTAATATGGTAGCATGATTGCGGGTTTAGTGGGGGTATTA
 TGGTAGTTTGTATATGGTGGTGTGTTGATGCAATTTGTGAGATTATAAATGAAATGTTATTCTCTGTTTA
 CAACTTTCTAAGCAATGGTATGTCATGTTTGTATC

Figure 10a : Localisation des amorces RtCiSst1 sur l'ADNc de la SST (sucrose : sucrose fructosyle transférase)

Taille attendue pour l'amplicon : 268 bp

CCGAGTACACTTGGCCCATTTCCCTCGAACAATGAAAAAGCCGGAACCCCTTAAGTGACCTTGAGGATGCA
 TCCAAACCGCACTCCCTTATTAGACCAACCTGCACCAACACCGGCCGCGCTGAAAAAGCAGTCGTTGCTCA
 GGGTCTGTCCAGTATCACATTTGGTGTCTCTGTCTCTGTTTACGTTTTCGTACTCATCGCTCCTGAACCA
 GCAAGATTCCACGAAACCGCACTGCCAATTTAGCACTGCGGAGAAATCTTCGGCTCAACACTCATGATCC
 GATCGCCTGACATGGGAAAGAACAGCTTACCATTTTCAGCCAGCCAAAAATTTTCATCTACGATCCCAATG
 GGCACATGTTCCACATGGGTGGTACCATCTTTCTATCAATACAACCCGTACGCTCCAATTTGGGGCAA
 CATGTCTAGGGGTACGCCGTGTCCAAAGACATGATCAACTGGTTCGAGCTTCCGTTAGCCTTGACACCA
 ACCGAGTGGTACGATATCGAGGGGCTCTTATCCGGTCCACCAACCGCCCTCCCCAACGGTCAAATCTTTG
 CATTTGACACCGGAAATGCTAATGATTCTCTCAACTACAATGCAAGCTGTTCCGTTAAACACATCTGA
 CCCACTCCTTCTCGAGTGGGTCAAATACGAGAATAACCAATCTTGTTCACTCCACAGGATTTGGATTA
 AAAGACTATCGGGACCCGCTCTACAGTTTGGACGGGTCTGATGGAACATCGGATGATCATGGGCACTA
 AAATAAATCGTACTGGACTCGTACTGTTTACCATATACTACCGACTTCAACAACTATGTAATGTTGGAGGA
 GCCGTTGCAATTCGGTTCGCCGATACCGATATGTGGGAATGTGTGACTGTGACCTGTGTCAACAATTAAT
 GACAGCGCACTTGATATCGCGCTTATGCTCCCGATATGAAGCATGTGATTAAAGAAAGTTGGGAGGGAC
 ATGGGATGGACTGTTACTCGATTGGGACATATGATGTGATAAAGCATAGTGGACCCCGGATAACCCGGA
 ATTGGACGTGGGTATTGGGTTAAGAGTCAATTACGGGAGGTTTTTTGTCATCAAGAGTCTTTATGACCCG
 TTGAAGAAACCGAGGGTCACTTGGGTTATGTTGCGAATCGGACAGTGCAGCAGGACCTTAATAGAG
 GGTGGGCTACTATTATCAACGTTGCAAGAACCATTTGTCTAGATGAAAGACCGGAACCCATCTACTTCA
 TTGGCCTGCTGAGGAAATTTGAGAGTTTGGAGATATGATGTCGTGAATTTAAAGAGATCGAGCTTGCAACG
 GGTTCGATCATGCCACTGCACATAGGCCCGGCTACGCACTGGACATAGTTGCCACATTTGAGGTGGAAC
 AAGAGACGTTTATGAGGACAAGTGACACAAATGTTGAATACGGTTGCCACGAGCGCGGGTGCACACGGA
 AAGGGGAAGTTTGGGACCGTTTGGGATCGCGGTTCTTGTGATGGAACACTCTCGGAATTAACCTCCTGTG
 TATTTCTATATTTTCAAAAGACAGATGGAAGCGTTGCAACACATTTTGTACCGATAAGCTAAGGTCA
 CACTGGATTATGACGGGGAGAGTGGTATACGGGAGCACTGTCCCTGTACTCGATGGTGAAGAACTCAC
 AATGAGGTTACTGTTGATCATTTCACTAGTGGAGGGGTTTGCAATGGGAGGAAGGACAGTAATGACATCA
 CGAGTGTATCCCAAAAGGCAATATATGAAGGAGCCAGATCTTCTTGTTCACAAATGCGACTCATACCA
 GTGTGAAGGCATCTCTCAAGATCTGGCAAAATAGCTTCTGTACGAATCCAGCCTTACCCCTTTTGTATTAT
 TCGTTTCAATGACATGCTCTTTTATTATATATATTCATGATTTTATTTTCTCTAGGTAATAAGAAAC
 TTTTATGTTGTTGGGTTTAAATTTGGAATTATCAATTAATGAGAAATGAGAACATGTTGTTTAAATCATC
 TGTTTAAAAA

Figure 10b: Localisation sur l'ADNc de la FFT (fructane : fructane fructosyle transférase)

des amorces RtCiFft1. Taille attendue pour l'amplicon : 220 bp

des amorces RtCiFft2. Taille attendue pour l'amplicon : 204 bp

```
Cichorium intybus beta-tubulin mRNA, partial cds
>AF101419
CCCGAATCTCGGTTTCTCTCTTTCACCACCAGTAAAGATGCGTGAGATCCTTCATATTC AAGGTGGTCAAT
GTGGAAACCAGATCGGAGCTAAGTTCTGGGAGGTTGTCTGCGCCGAGCACGGCATTGATGTGACCGGAAAG
TACACCGGAGACTCCGAGCTCCAGCTTGAGAGGATCAATGTCTATTACAACGAGGCCAGTGGCGGGAGGTT
TGTTCGCGTGCGGTGCTTATGGATCTGGAGCCAGGGACGATGGACAGTCTCAGATCTGGTGCCTACGGAC
AGATCTTCAGGCCTGATAACTTTGTCTTTGGTCAGTCTGGTGCCGGTAACAATTGGGCGAAGGGACATTAT
ACTGAAGGTGCTGAGTTGATCGACTCGGTTCTGGATGTTGTAGGAAGGAGGCCGAAAATTGTGATTGCTT
ACAAGGTTTCCAGGTATGCCATTCTCTAGGAGGTGGTACAGGATCTGGTATGGGAACACTTCTGATCTCNA
AGATCAGGGAAGAATATCCAGACAGGATGATGATGACCTTCTCTGTCTTTCCATCTCCA
```

Figure 10c : Localisation des amorces tubuline de chicorée (CiNDtub5/3)

Taille attendue pour l'amplicon : 310 bp

L'analyse des amorces a été réalisée à l'aide des logiciels OLIGO et DNA strider 1.2. Les propriétés des amorces utilisées au cours de ce travail sont disponibles en annexe 3. Ci-dessous sont présentées les séquences des amorces RtCiSst1 et RtCiFft1 dirigées respectivement contre les SST et FFT de *C. intybus*.

| | |
|-----------|-----------------------|
| RtCiSstg1 | CCCAATTTTGTTCCCACCG |
| RtCiSstd1 | CTTCATGTCCAACCATTCG |
| RtCiFftg1 | GATTTCTCTCAACTACAATGC |
| RtCiFftd1 | GGTAAACAAGTACGAGTCCA |

Une autre paire d'amorces déjà disponible au sein du laboratoire a également été utilisée : il s'agit de CiNDTub3/CiNDtub5.

| | |
|----------|----------------------------|
| CiNDTub3 | GAT-CAA-CTC-AGC-ACC-TTC-AG |
| CiNDTub5 | ACC-AGA-TCG-GAG-CTA-AGT-TC |

Cette paire d'amorce amplifie un fragment de tubuline de 310 bp et servira de standard interne pour comparer l'évolution du niveau d'expression d'autres transcrits. Le niveau de transcrit de la tubuline semble en effet être constant pendant toute la saison chez la chicorée. La localisation des amorces et la taille attendue pour les amplicons sont présentées dans les figures 10a à 10c.

3. Test des amorces

Les premières amplifications de FFT, réalisées avec les amorces RtCiFftg1 et RtCiFft1, présentaient deux bandes de 220 bp et 400 bp. Ceci est ennuyeux puisqu'il est envisagé de quantifier le produit d'amplification ; il serait préférable qu'il n'y ait qu'un seul amplicon présent. Pour pallier ce problème, une seconde paire d'amorces a été déterminée pour la FFT.

| | |
|-----------|----------------------|
| RtCiFftd2 | AAGTGACCCTCCGTTTCTTC |
| RtCiFftg2 | GTCCCGATATGAAGCATGTG |

Des amplifications de contrôle avec ces nouvelles amorces, ainsi que les paires d'amorces RtCiSst1 et RtCiFft1, ont été réalisées. Le mélange PCR était composé tel que décrit dans la section matériel et méthode, ainsi que le programme d'amplification de 35 cycles à 55°C. Ce test a permis de choisir la paire qui donne la meilleure amplification sur le fragment de FFT (figure 11a à 11c).

L'absence de bande pour les amplifications réalisées avec une seule amorce a confirmé leur spécificité. L'absence de bande lorsqu'il n'y a pas de matrice a assuré l'absence de contamination par de l'ADN étranger. Enfin, l'amplification du fragment de tubuline (310 bp) a confirmé la qualité du matériel utilisé comme matrice. Les bandes amplifiées étaient aux tailles attendues, c'est-à-dire à 268 bp pour les amorces RtCiSst1, 220 bp pour les amorces RtCiFft1 et 204 bp pour les amorces RtCiFft2.

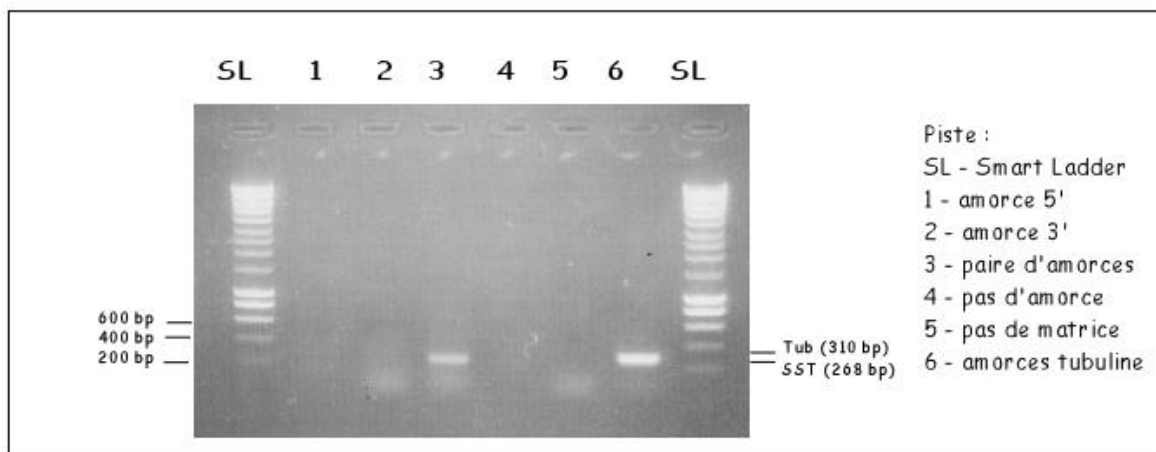


Figure 11a : Test d'amplification PCR avec les amorces RtCiSst(f/g)1, agarose 1%

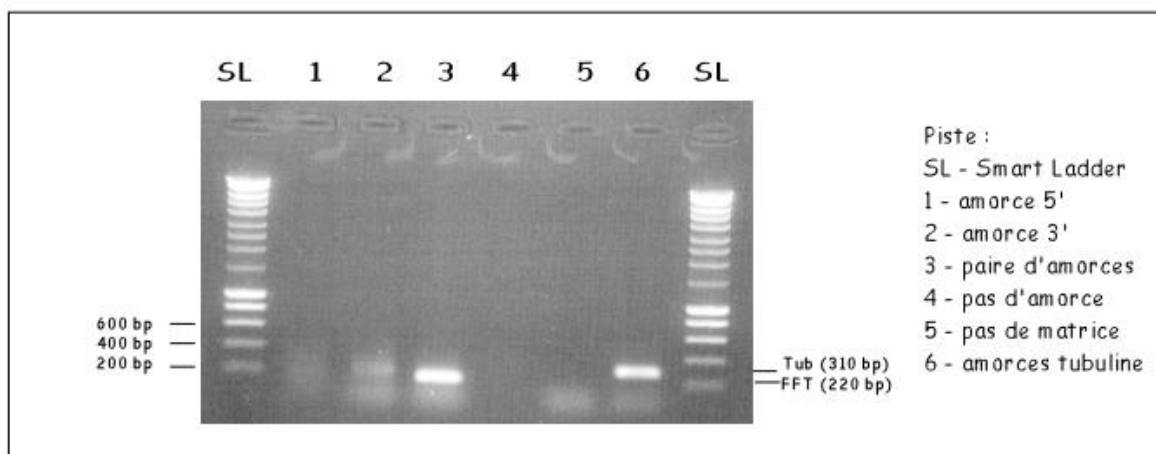


Figure 11b : Test d'amplification PCR avec les amorces RtCiFft(f/g)1, agarose 1%

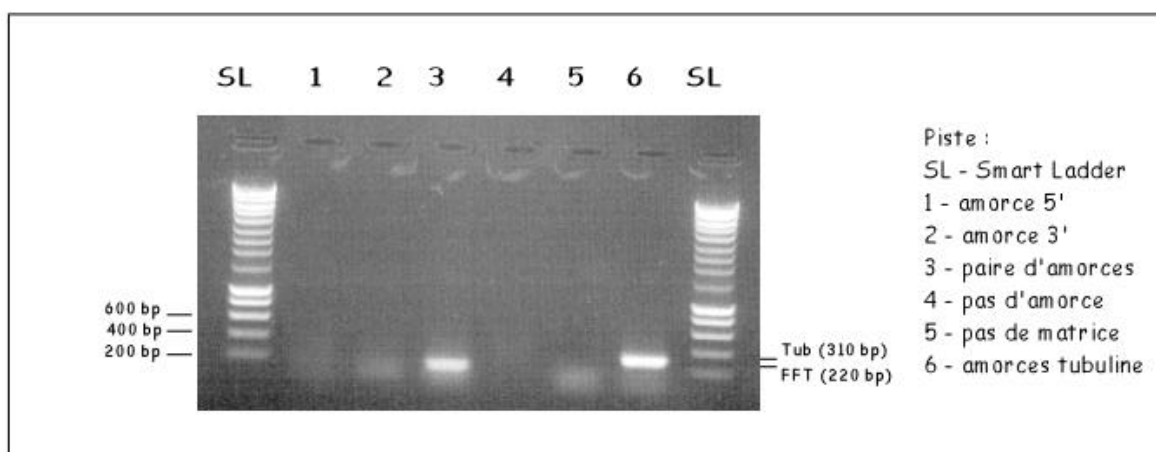


Figure 11c : Test d'amplification PCR avec les amorces RtCiFft(f/g)2 , agarose 1%

Etant donné que la nouvelle paire fonctionnait correctement, ce sont les amorces RtCiFft2 qui ont été utilisées pour la suite, bien qu'aucune anomalie n'ait été révélée dans ce test par l'utilisation des amorces RtCiFft1. En ce qui concerne les amorces dirigées contre la SST, le test a prouvé leur bon fonctionnement.

4. Mises au point de l'amplification en duplex et de la séparation des fragments

Lors de la RT-PCR semi-quantitative en duplex, il faut amplifier simultanément les fragments de SST (ou de FFT) et de tubuline au sein du même mélange réactionnel. La tubuline sert de standard interne et permet une comparaison individuelle de l'intensité pour chaque amplification du gène étudié, sans avoir de doute sur la quantité de matrice introduite (incertitude due au pipettage).

Les amplicons attendus pour les trois gènes sont de tailles très proches (tubuline : 310 bp, SST : 268 bp et FFT : 220 bp). Bien que cette faible différence de taille soit voulue, puisqu'elle permet aux trois fragments d'être amplifiés sans trop de biais dû à la taille des produits, elle présente également un inconvénient : la difficulté à séparer suffisamment les fragments produits. Les gels de polyacrylamide permettant de distinguer des différences d'un seul nucléotide, comme c'est le cas par exemple des gels de séquençage, seront donc utilisés pour la mise au point de la RT-PCR semi-quantitative en duplex.

4.1. Mise au point de la PCR en duplex

Cette mise au point a deux objectifs : (1) vérifier l'amplification en duplex et (2) la résolution du gel.

Des fragments d'ADN sont synthétisés à partir des 3 gènes : SST, FFT et tubuline. Les produits d'amplification seront mis à migrer seuls (référence) ou en mélange (SST/Tubuline ou FFT/Tubuline).

Pour vérifier la possibilité d'amplifier simultanément des fragments de SST et de tubuline ou de FFT et de tubuline, on procède à des amplifications duplex avec le mélange d'enzymes Expand (Roche) alors que les amplifications simples se font avec de la Taq polymérase (Roche). On a en effet constaté que, lorsque plusieurs paires d'amorces sont utilisées dans le même milieu réactionnel, l'amplification avec un mélange de Taq et de Pwo est plus efficace que la Taq seule.

La séparation des amplicons sur gel devrait être la même dans les deux conditions (mélange d'amplifications simples ou duplex).

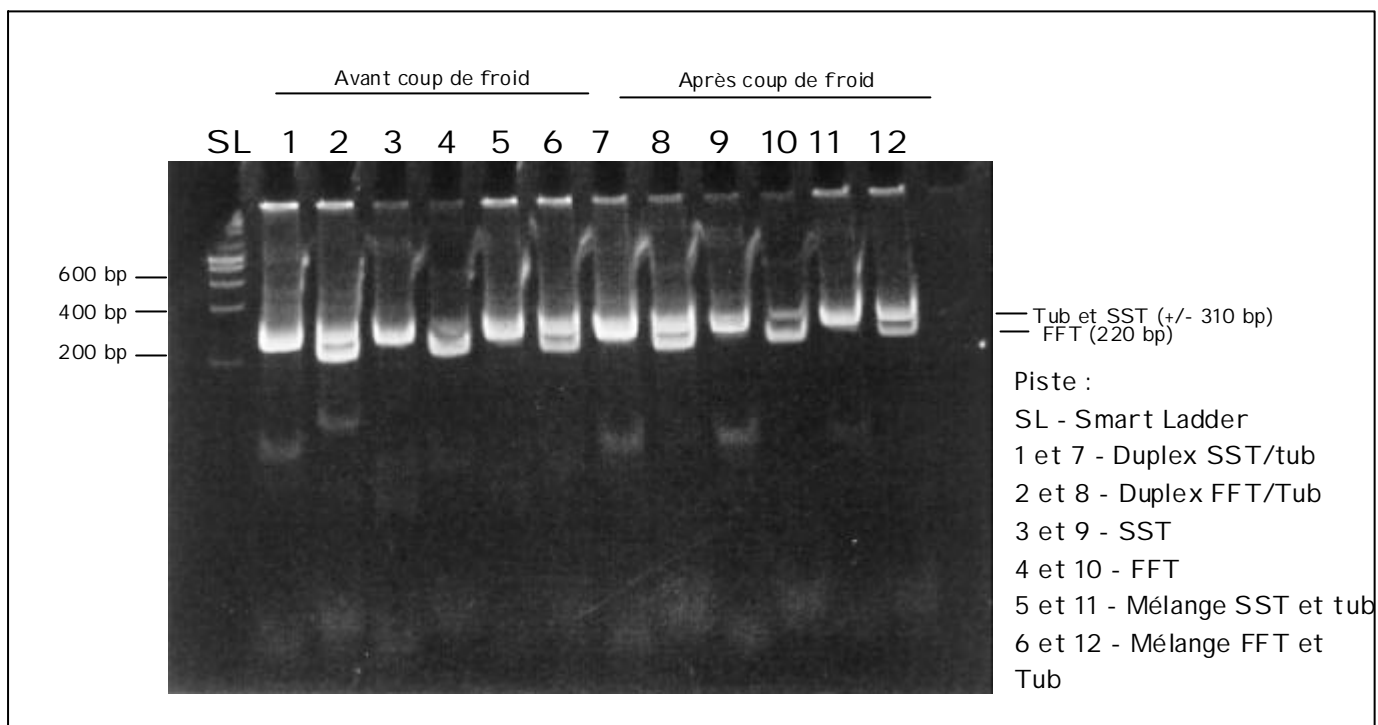


Figure 12 : Amplification en duplex SST/Tub et FFT/tub, amplication simple des fragments de SST et de FFT sur les ADNc 7 et 12, séparation des fragments du duplex, des fragments amplifiés seul, et des fragments amplifiés seuls mélangé avec des fragments de tubulinegel polyacrylamide 10 %

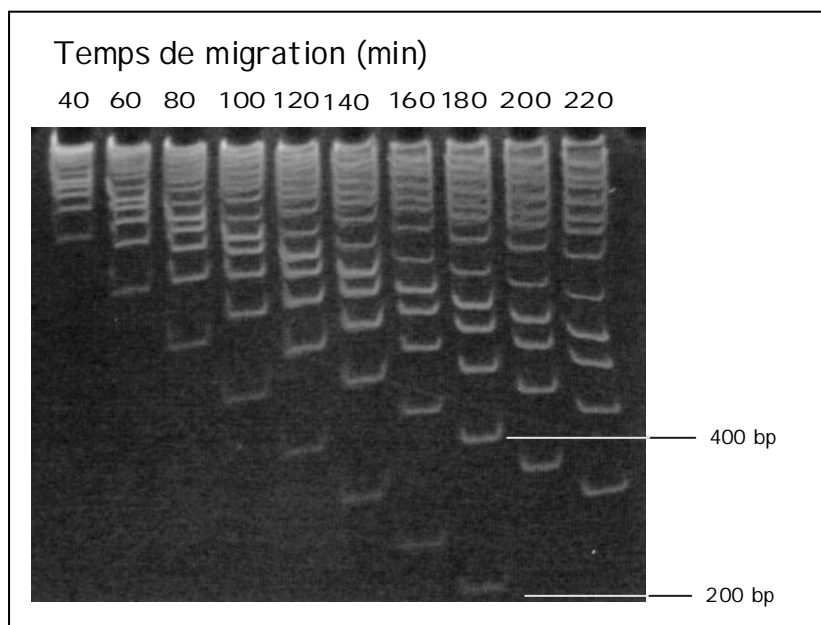


Figure 13 : Mise au point du temps de migration en gel de polyacrylamide 10 % pour une séparation optimale de fragments d'ADN de 200 et 400 bp.
La séparation optimale s'observe pour une migration de 180 min.

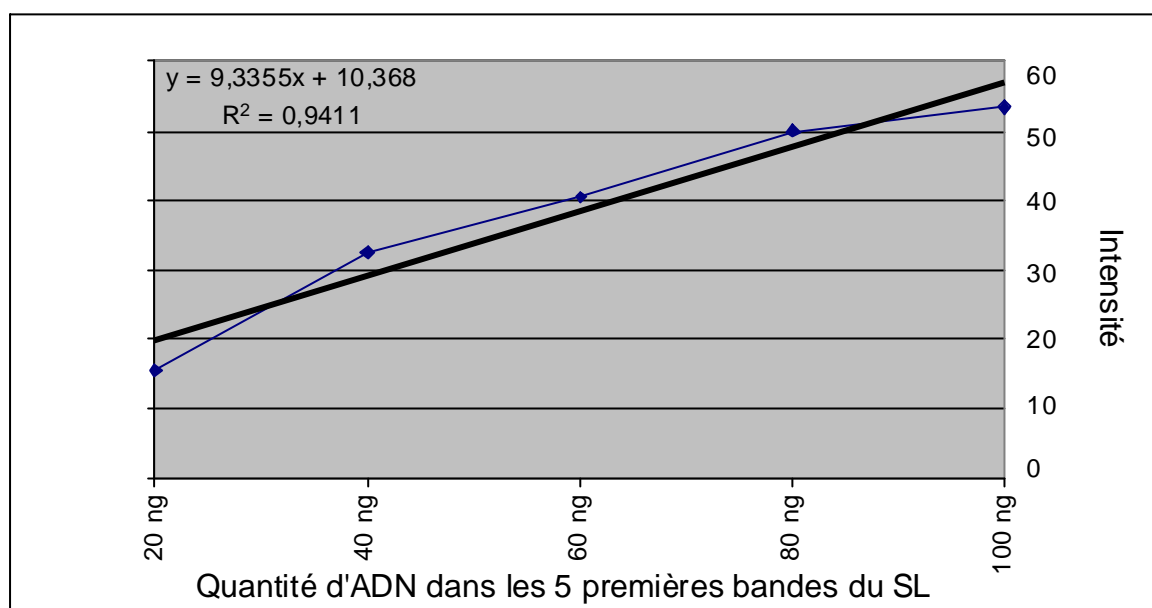


Figure 14 : Linéarité des intensités du Smart Ladder sur gel de polyacrylamide

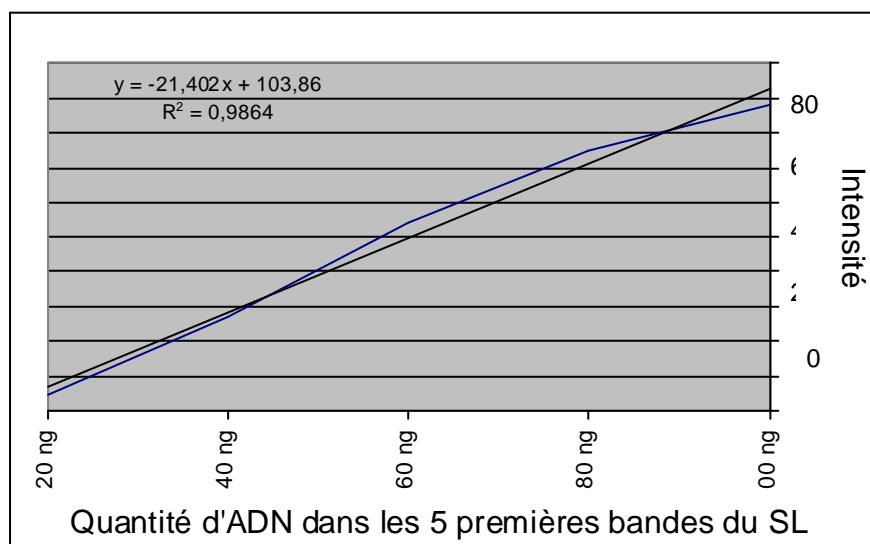


Figure 15 : Linéarité des intensités des bandes du Smart Ladder sur gel d'agarose haute résolution 3 %

Le programme d'amplification utilisé est le suivant : **RTSST**

| Température (°C) | Temps (min) | Nombre de Cycle(s) | Etapas |
|------------------|-------------|--------------------|---------------------|
| 94 | 10 | 1 | Dénaturation |
| 94 | 1 | 40 | Dénaturation courte |
| 55 | 1 | | Hybridation |
| 72 | 1 | | Elongation |
| 72 | 10 | 1 | Elongation longue |
| 4 | 8 | | Conservation |

Les produits de l'amplification en duplex ont été chargés tels quel et les produits d'amplification en Taq ont été chargés seuls ou en mélange (fig. 12) sur gel de polyacrylamide 10 % pour l'électrophorèse. Dans les puits 1, 5, 7 et 11 les bandes SST et tubuline ne se distinguent pas. C'est la migration du mélange SST-simple/tubuline-simple qui indique que les deux bandes n'ont pas été séparées (pistes 5 et 11). Il n'est pas possible de distinguer les deux amplicons (de 310 et 268 bp) alors que ceux-ci sont bel et bien présents lorsqu'ils migrent dans des pistes isolées (pistes 3, 4, 9 et 10). On en conclut que la séparation obtenue après une heure de migration, temps mis pour observer la sortie du bleu de chargement, n'est pas suffisante. Le temps de migration doit être optimisé. Néanmoins, dans une même piste (pistes 2, 6, 8, 12) et dans les deux conditions, l'amplicon de la FFT est bien séparé de celui de la tubuline : cette partie du test est concluante, que ce soit en duplex ou en mélange.

4.2. Mise au point du temps de migration

Cette mise au point est réalisée en utilisant le Smart Ladder (Eurogentec) comme standard de poids moléculaire. Il s'agit de déterminer le temps maximum de migration sur gel de polyacrylamide 10 % pour une séparation optimale des bandes de 200 et de 400 bp.

La mise au point est effectuée en chargeant toutes les 20 minutes un échantillon de Smart Ladder (fig. 13). Sur base de ces résultats, le temps optimal nécessaire s'avère être 3 h en gel 10 %. Cependant, en plus de la séparation, ces gels devront servir à détecter des variations d'intensités. La détection des fragments se fait en incubant le gel dans un bain de bromure d'éthidium (à une concentration de 0.6 mg/ml). Or, suite à l'analyse des intensités des 5 bandes inférieures du Smart Ladder correspondant à des quantités connues (fig. 9), la linéarité quantitative présente dans l'échantillon (20, 40, 60, 80 et 100 ng d'ADN) n'est retrouvée que pour les trois quantités centrales et s'écartent de la droite de calibration pour les valeurs extrêmes (fig. 14). Bien que divers tests aient été réalisés (non illustré) afin d'optimiser le temps de coloration, il n'a pas été possible d'obtenir de résultats concluants. Dès lors, les mêmes essais de quantification ont été réalisés sur gel d'agarose haute-résolution, Nusieve GTG agarose (BMA) (fig. 15) Ici, la linéarité est présente pour lesdans sa totalité et les fragments SST et tubuline sont bien séparés. En conclusion, nous poursuivrons l'étude sur ce type de gel.

Bien que les mises au point aient été entamées sur gel de polyacrylamide afin d'obtenir la meilleure résolution pour la séparation de fragments de tailles semblables (220, 268 et 310 bp) plusieurs inconvénients de son utilisation se sont présentés.

Le principal ennui est la présence de traînées de part et d'autre du fragment amplifié. Ces traces n'auraient pas permis de quantifier correctement les bandes d'intérêt amplifiées.

La première des solutions envisagées était alors d'utiliser des gels de polyacrylamide contenant de l'urée. Cet agent en dénaturant les structures secondaires de l'ADN améliore la résolution de migration. Cependant, bien que ces gels permettent une bonne séparation des fragments, la quantification risquait d'être erronée. En effet, suite au test réalisé sur Smart Ladder, il est apparu que les valeurs mesurées sur le standard après coloration au BET pour des quantités de 20 et 100 ng s'éloignaient de la linéarité présente pour les échantillons de 40, 60 et 80 ng.

Quoiqu'il en soit, en plus du problème observé au niveau de la quantification, il est apparu que l'utilisation de bains de bromure d'éthidium pour la coloration des gels n'était pas compatible avec les consignes de biosécurité.

Dès lors, l'utilisation du gel d'agarose haute résolution s'est imposée comme étant l'alternative incontournablea été envisagée, non seulement pour obtenir un profil de migration plus propre et une meilleure quantification mais aussi pour travailler dans des conditions plus sécurisantes pour l'ensemble des chercheurs du labo.

5. RT-PCR (semi-quantitative) sur les gènes FFT et SST

5.1. Recherche de la phase "plateau"

Pour que les déterminations des niveaux de transcrits soient basées sur les mêmes critères pour chaque échantillon, nous avons pris le niveau de transcrits de la tubuline comme standard "interne".

Avant de quantifier les signaux obtenus sur gel, nous avons déterminé le nombre optimal de cycles PCR nécessaire pour l'amplification de la SST, de la FFT et de la tubuline afin de se trouver dans la phase exponentielle de l'amplification.

Cette mise au point a été réalisée sur les ADNc issus de deux prélèvements : l'échantillon n°1 du 27.07.1999 avant le coup de froid, et l'échantillon n°14 du 25.01.2000 après le coup de froid. Les amplifications ont été réalisées en tubes séparés et prélevés tous les cinq cycles à partir du quinzième cycle. Le travail en tubes séparés permet de limiter les problèmes inhérents au prélèvement dans un tube unique contenant un grand volume de mélange réactionnel.

a) Duplex FFT/tubuline

Le mélange réactionnel général contient :

| produits | concentration | Volume (µl) |
|-------------------------|---------------|-------------|
| H ₂ O | | 111.9 |
| Tampon 1 Expand (Roche) | 10x | 15 |
| Expand (Roche) | 3 U/µl | 2.1 |
| dntp | 10 mM | 3 |
| amorce CiNDtub3 | 100 pmole | 3 |
| amorce CiNDtub5 | 100 pmole | 3 |
| amorce RtCiFftg2 | 100 pmole | 3 |
| amorce RtCiFftd2 | 100 pmole | 3 |
| | | 144 |

Ce mélange a été divisé en deux tubes de 72 µl, auxquels il faut encore ajouter 3 µl d'ADNc (1 ou 14). Ces mélanges ont alors été répartis par 10 µl dans 2 x 7 tubes. Les fragments amplifiés ont été analysés sur gel d'agarose haute-résolution 3 % (Nusieve GTG agarose, BMA) (Fig. 16)

Dans chacune des pistes, on remarque que les fragments de FFT et de tubuline ont été amplifiés simultanément et séparés correctement. Depuis la première piste jusqu'à la sixième, l'intensité des bandes augmente régulièrement et atteint un maximum correspondant à la phase plateau. Ceci indique que l'amplification est maximale après 40 cycles PCR. Le nombre optimal de cycles a été choisi de manière à ce que l'amplification soit encore dans sa phase exponentielle pour l'amplicon présent en plus grande quantité, la tubuline dans notre cas. En fonction de ces critères et résultats, nous avons choisi 35 cycles d'amplification pour le test duplex.

b) Duplex SST/tub

La détermination de la phase plateau pour le duplex SST/tub a été réalisée dans les mêmes conditions que pour la FFT (voir ci-dessus), si ce n'est que le mélange réactionnel contient les amorces RtCiSst plutôt que RtCiFft (fig. 17)

Les résultats obtenus montrent que la phase plateau pour l'amplicon présent en plus grande quantité (la tubuline) est atteinte au 35ème cycle. Pour se trouver dans la phase exponentielle lors de la RT-PCR, nous avons choisi de travailler avec 30 cycles pour le couple d'amorces SST/tubulines.

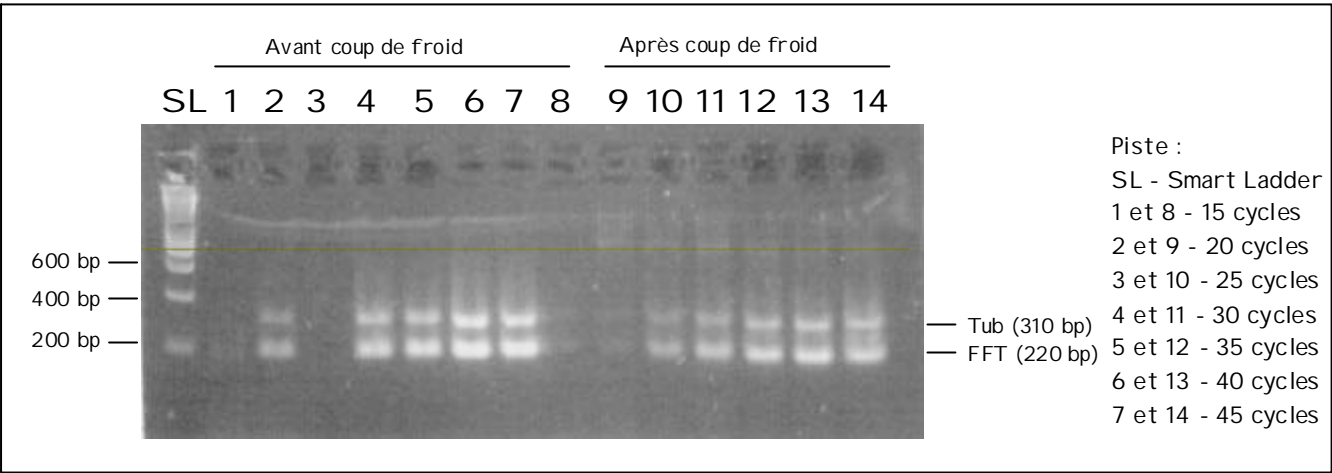


Figure 16 : Détermination de la phase plateau pour la PCR duplex FFT/Tub à 55°C, ADNc ss 1 (27/07/1999 - avant coup de froid) et 14 (25/01/2000 - après coup de froid), agarose haute résolution 3 %

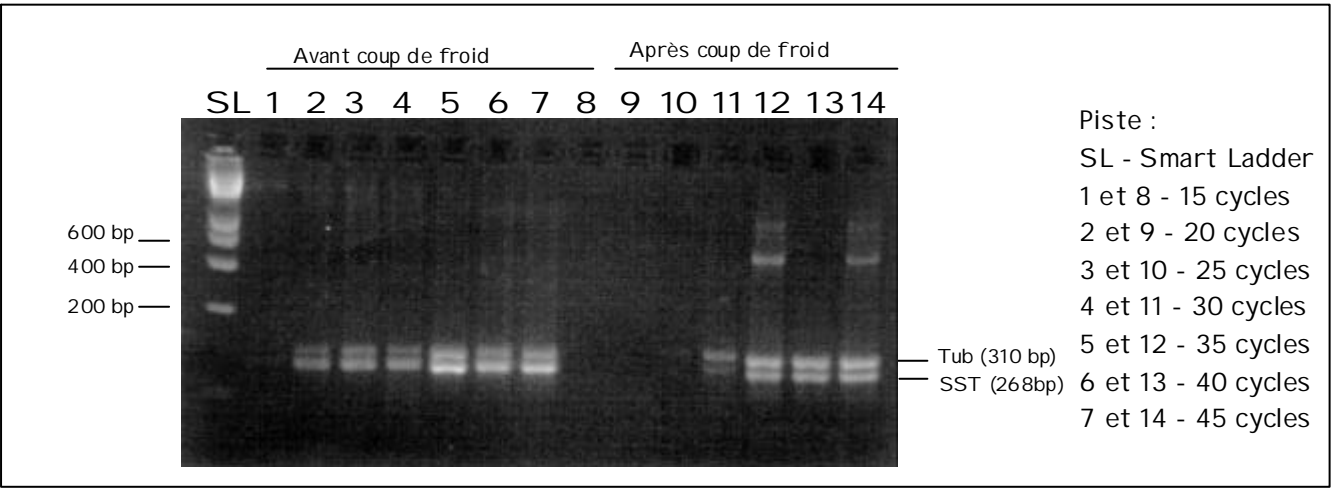


Figure 17 : Détermination de la phase plateau pour la PCR duplex SST/Tub à 55°C, ADNc ss 1 (27/07/1999 - avant coup de froid) et 14 (25/01/2000 - après coup d efroid), agarose haute résolution 3 %

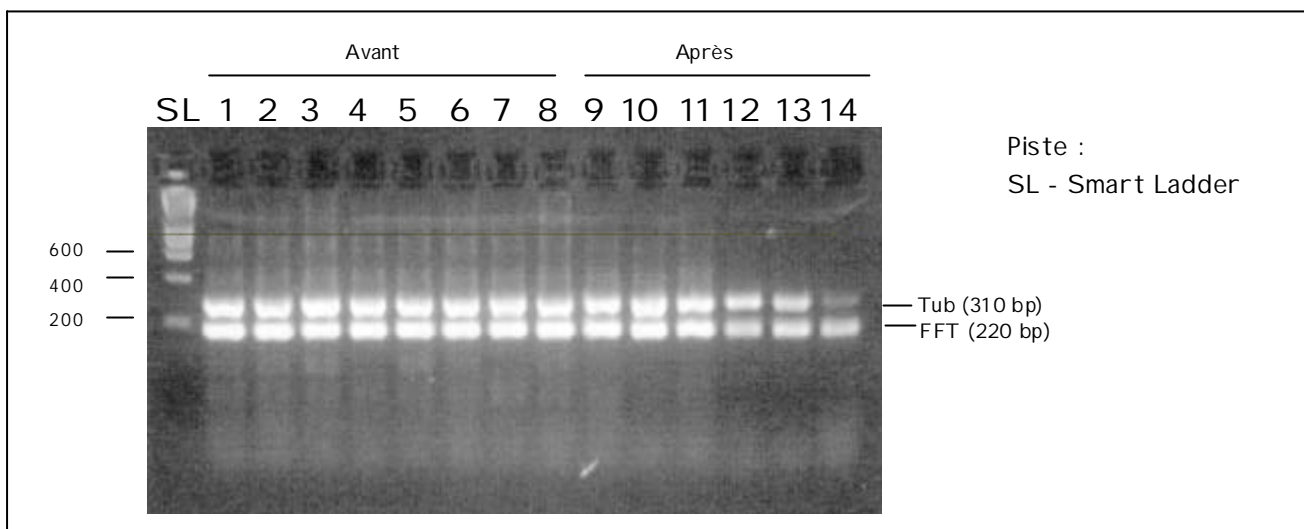


Figure 18 : Amplification duplex FFT/Tub, 35 cycles à 55°C, sur les 14 échantillons (du 27/07/1999 au 25.01.2000), agarose haute résolution 3 %

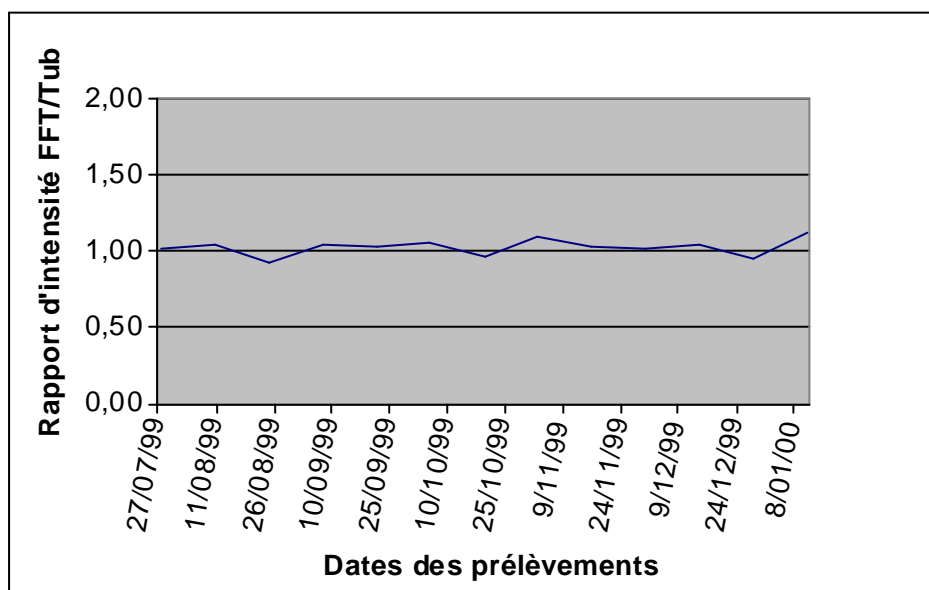


Figure 19 : Evolution du taux de transcrit de ka FFT au cours de la saison dans la racine de chicorée

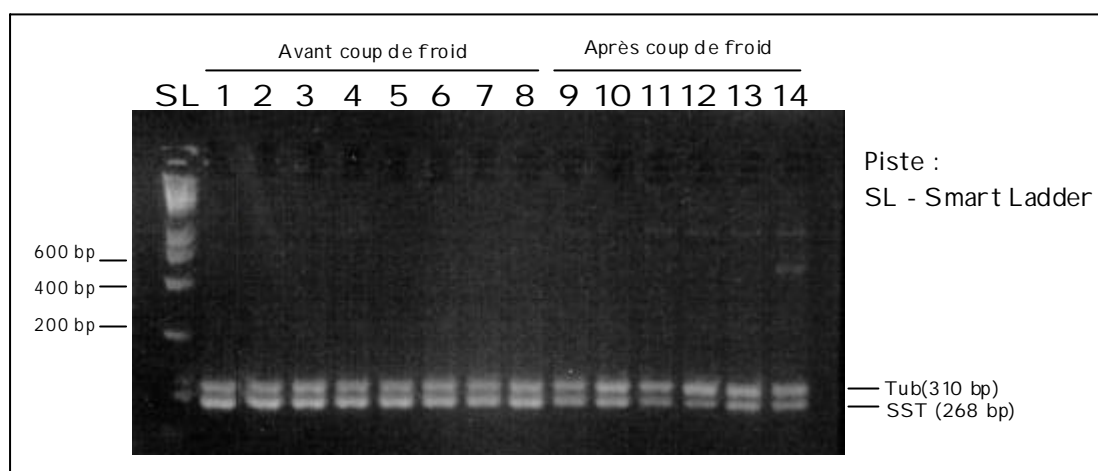


Figure 20 : Amplification duplex SST/Tub sur les 14ADNc ss (du 27/07/1999 au 25/01/2000), agarose haute résolution 3 %

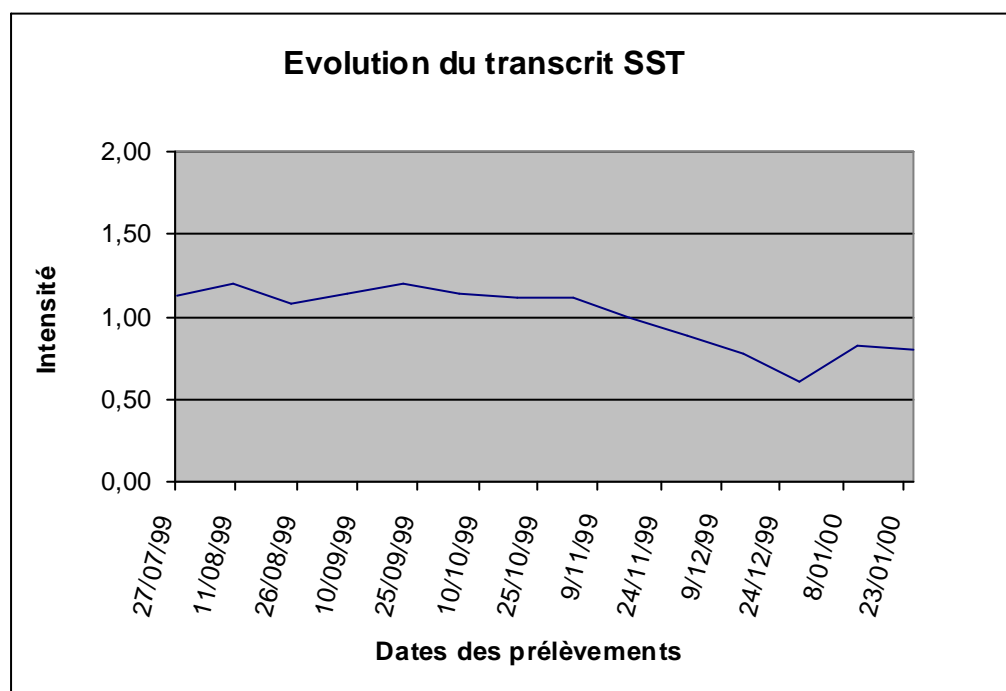


Figure 21 : Evolution du taux de transcrit de la SST au cours de la saison dans la racine de chicorée

6. RT-PCR duplex semi-quantitative

Températures correspondants aux dates de prélèvement

| Prélèvement | Date | T° Min | T° Max |
|-------------|----------|--------|--------|
| 1 | 27-07-99 | 11,4 | 24,4 |
| 2 | 10-08-99 | 14,6 | 22,7 |
| 3 | 24-08-99 | 9,1 | 23,1 |
| 4 | 07-09-99 | 13,6 | 22,4 |
| 5 | 21-09-99 | 14,0 | 20,4 |
| 6 | 05-10-99 | 6,6 | 13,4 |
| 7 | 19-10-99 | 1,4 | 11,4 |
| 8 | 02-11-99 | 9,3 | 14,1 |
| 9 | 16-11-99 | -4,4 | 4,0 |
| 10 | 30-11-99 | 6,4 | 11,1 |
| 11 | 14-12-99 | 2,5 | 6,0 |
| 12 | 28-12-99 | 3,2 | 5,2 |
| 13 | 11-01-00 | -1,2 | 3,5 |
| 14 | 25-01-00 | -4,3 | 3,9 |

6.1. FFT-tub

Les conditions optimales pour l'analyse des données étant connues, les 14 échantillons peuvent être testés.

Le mélange réactionnel général pour l'amplification est identique à celui utilisé pour la cinétique. 9.6 µl de ce mélange ont été déposés dans chacun des 14 tubes auxquels 0.4 µl d'ADNc correspondant a été ajouté. Les fragments d'intérêt ont été amplifiés avec le programme RTSST et analysés sur gel d'agarose 3 % (fig. 18).

Le gel a été analysé avec le logiciel Quantity One (Biorad). Les intensités moyennes des bandes ont été mesurées pour les fragments de FFT et pour la tubuline. L'intensité du bruit de fond a été déterminée de la même manière. La standardisation se fait au moyen de la formule suivante : $(\text{FFT-bruit de fond})/(\text{tub} - \text{bruit de fond})$

Ces rapports d'intensités relatives ont été portés en graphique (fig. 19). Nous constatons que le niveau de transcrits FFT reste constant durant la saison. L'exposition au froid ne semble donc pas affecter le taux de transcription de la FFT. Pour des raisons de lisibilité, la valeur (2.92) du 25.01.00 n'est pas positionnée sur le graphe. La valeur obtenue pour la tubuline y est anormalement faible en comparaison avec la bande présente, pour la même date, dans le gel SST/tubuline.

6.2. SST-Tub

L'amplification sur les ADN-c issus des 14 échantillons récoltés en 1999-2000 a été réalisée dans les conditions optimales déterminées (fig. 20) et analysée comme décrit précédemment (fig. 21).

Nous observons une nette diminution des niveaux de transcrits SST suite à l'exposition au froid (fig. 22). Il apparaît que la diminution du niveau de transcrit peut être détectée pour la première fois au niveau de l'échantillon prélevé le 21/09/99 (5). Bien qu'à ce moment cette diminution soit faible, elle se confirme au niveaux des 2 échantillons suivants (6 et 7). Une stabilisation a ensuite été perceptible entre les échantillon 7 (19/10/99) et 8 (02/11/99).

Une seconde chute du niveau de transcrit, cette fois plus importante, a été observée à partir de l'échantillon 9 (16/11/99). Il est intéressant de constater que cette seconde diminution correspond à la première exposition à des températures inférieures à 0°C: la température minimale observée lors du prélèvement 9 étant de -4.4°C. On constate qu'une fois cette température atteinte, le processus de diminution de transcrit semble irréversiblement enclenché. On observe, en effet, que bien que les prélèvements 10 et 11 (03/11 au 14/12) aient été réalisés à des températures comprises entre 2.5 et 6.4°C, c'est à dire au dessus du seuil des 0°C, le taux de transcrit ne cesse de chuter. L'échantillon 12 (28/12) semble être l'échantillon présentant le taux de transcrit SST le plus faible. On voit, en effet, une ré-augmentation au niveau de l'avant-dernier prélèvements (13), bien que la température minimale observées soient de -1,2°C. Cette augmentation ne semble cependant pas définitive puisque le dernier prélèvement (14) montre une stabilisation voir une faible diminution des taux de transcrit SST par rapport au prélèvement 13. Ces échantillons étant les derniers dont nous disposons, il est difficile de se prononcer quand à une remontée effective et définitive du niveau de transcrit SST à partir du 11/01/00 (prélèvement 13).

On peut conclure de cette expérience que le taux de transcrits SST est manifestement influencé par les variations de température. Une fois le seuil critique atteint, la diminution du transcrit observée semble être déclenchée de manière irréversible, malgré le retour à des températures supérieures à 5°C. 0°C est très certainement proche de ce seuil critique puisque la température de 1,4°C observée au niveau du prélèvement 7 semble insuffisante pour déclencher le forte diminution déclenchée par le passage à -4,4°C (prélèvement 9). La diminution du niveau de transcrits semble prendre fin aux alentours du 11/01/00 bien qu'aucune remontée significative de la température n'ait put être observée. Ce dernier point mérite d'être investigué plus en détail lors de travaux ultérieurs. Nous ne disposons, en effet, pas des prélèvements nécessaires à la poursuite d'une telle étude.

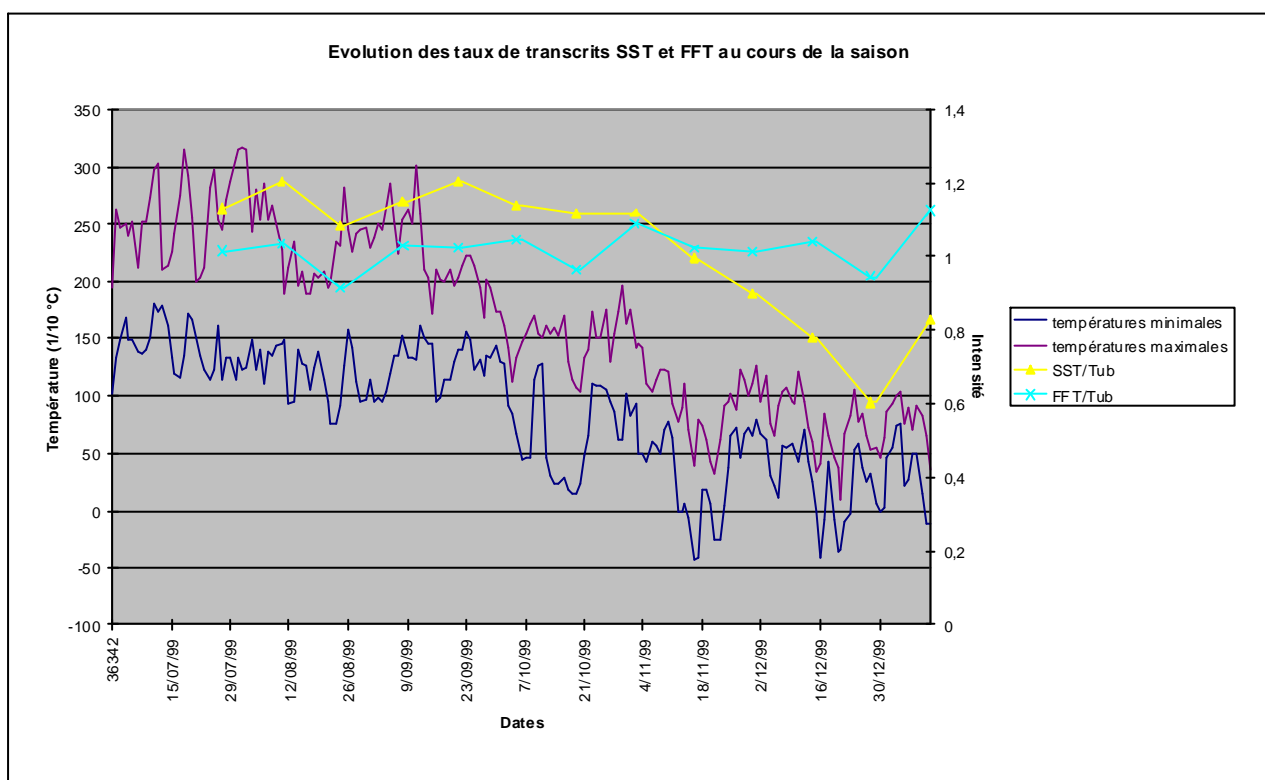


Figure 22 : Evolution des taux de transcrits de la SST et de la FFT au cours de la saison dans la racine de chicorée

6.3. Conclusions

Etant donné le peu de variation du taux de transcrit FFT, la suite de ce mémoire sera concentrée à l'étude du promoteur de la SST, puisque celui-ci semble manifester une certaine dépendance vis-à-vis du froid. L'étude de ce promoteur passera premièrement par l'isolement du promoteur par Genome Walker. Celui-ci sera ensuite progressivement raccourci et placé devant le gène rapporteur du plasmide pBI121. Les constructions ainsi obtenues seront introduites chez la chicorée et le tabac via *Agrobacterium*.

B - Analyse du promoteur

Nous avons choisi d'analyser le promoteur de la SST, enzyme apparemment régulée par le froid. La technique que nous avons retenue est celle faisant appel à l'utilisation du gène rapporteur GUS placé sous le contrôle du promoteur complet ou tronqué. Ceci nécessitait d'abord (1) le clonage du promoteur "complet", (2) la synthèse et le clonage de promoteurs tronqués, (3) la transformation de matériel végétal et enfin (4) l'analyse histochimique de tissus transformés.

1. Genome Walker

Le kit 'Genome Walker' (Clontech) permet l'amplification d'ADNg inconnu flanquant une séquence connue. Il sera utilisé ici pour amplifier le promoteur du gène SST au départ de l'ORF connu. La technique utilisée consiste à digérer aléatoirement de l'ADNg par des enzymes de restriction coupant à bouts francs. Aux extrémités générées sont greffés des adaptateurs de séquences connues et pour lesquels des amorces sont disponibles. Dès lors, l'amplification du promoteur peut avoir lieu en utilisant, d'une part, une amorce spécifique du gène correspondant et, d'autre part, une amorce s'hybridant sur l'adaptateur. Une seconde PCR au moyen d'amorces localisées à l'intérieur de l'amplicon précédent permet d'augmenter la spécificité de l'amplification.

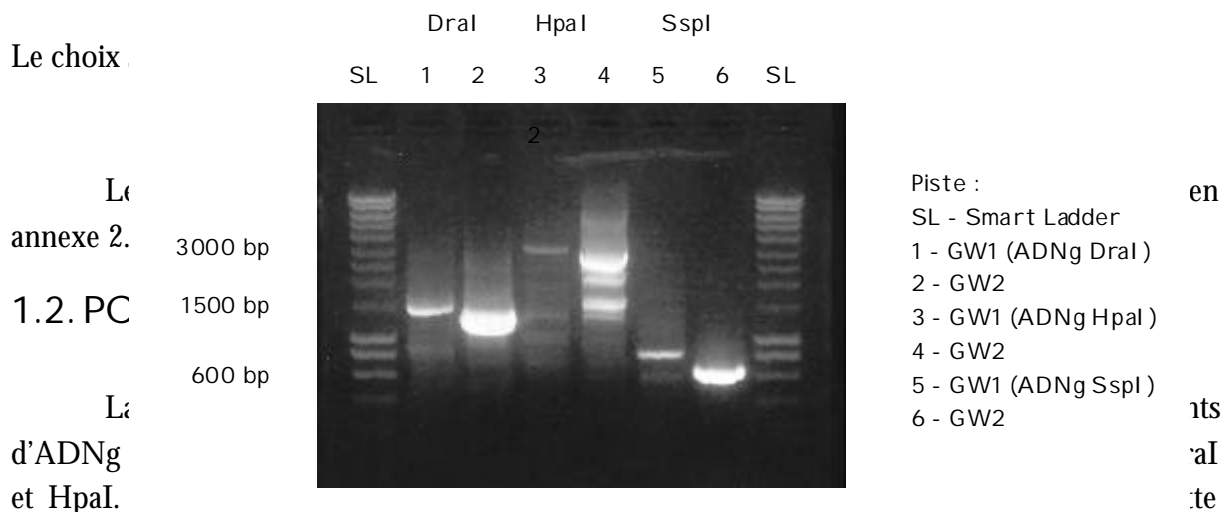
Une collection de fragments, issus d'ADNg de *C. intybus* digéré, ligués aux adaptateurs était déjà disponible au sein du laboratoire pour le cultivar étudié. Il restait à déterminer les amorces et à réaliser les amplifications.

1.1. Choix des amorces

Les amorces nécessaires à l'amplification sur ADN génomique devaient idéalement être déterminées sur base de séquence d'ADNg et non d'ADNc. Ces données n'étant pas disponibles, il nous a fallu nous contenter de la séquence d'ADNc de la SST dont nous disposions, afin de ne pas définir les amorces à cheval sur deux exons. De plus, bien qu'une séquence partielle de promoteur de SST de *C. intybus* de taille réduite ait été disponible au sein du laboratoire, il était intéressant de l'isoler à nouveau dans l'espoir d'en obtenir un fragment plus important.

Les amorces utilisées dans le cadre de 'Genome Walker' doivent répondre aux critères suivants :

- Longueur de 26 à 30 nucléotides
- Contenu de 40 à 60 % de GC
- Tm de 67 à 70°C
- Maximum de 3 C ou G dans les 6 nucléotides de l'extrémité 3'
- Absence de recouvrement entre les 2 séquences choisies
- Localisation le plus en amont possible de la séquence connue



amplification par PCR, avec les amorces AP1 et GwCiSstPrEx1, a lieu dans les conditions indiquées.

1.3. PCR secondaire (GW2)

La PCR secondaire réalisée avec les amorces AP2 et GSP2 (GwCiSstPrIn1) permet d'effectuer une seconde sélection sur les fragments d'ADN préférentiellement amplifiés lors de la PCR primaire. Cette PCR secondaire permet de sélectionner les fragments d'ADN qui ont une taille comprise entre 1000 et 1500 bp. Les collections d'ADN provenant de matrice respectivement digérées par les enzymes de restriction Drar, Hpal et Sspl.

La PCR secondaire réalisée avec les amorces AP2 et GSP2 (GwCiSstPrIn1) permet d'effectuer une seconde sélection sur les fragments d'ADN préférentiellement amplifiés lors de la PCR primaire. Cette PCR secondaire permet de sélectionner les fragments d'ADN qui ont une taille comprise entre 1000 et 1500 bp. Les collections d'ADN provenant de matrice respectivement digérées par les enzymes de restriction Drar, Hpal et Sspl.

La PCR secondaire réalisée avec les amorces AP2 et GSP2 (GwCiSstPrIn1) permet d'effectuer une seconde sélection sur les fragments d'ADN préférentiellement amplifiés lors de la PCR primaire. Cette PCR secondaire permet de sélectionner les fragments d'ADN qui ont une taille comprise entre 1000 et 1500 bp. Les collections d'ADN provenant de matrice respectivement digérées par les enzymes de restriction Drar, Hpal et Sspl.

1.4. Clonage

Afin de pouvoir disposer du matériel nécessaire à la réalisation des constructions évoquées précédemment, le fragment d'ADNg de 1300 bp obtenu par Genome Walker est cloné dans le plasmide pCRII.

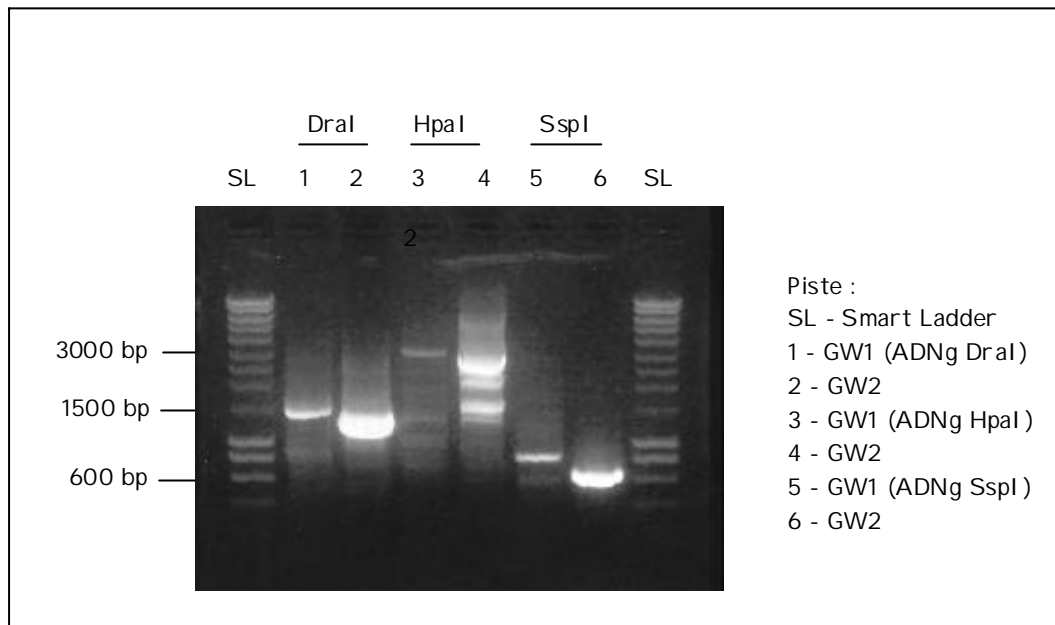


Figure 24 : Vérification des amplifications obtenues par la PCR secondaire de Genome Walker par rapport à l'amplification primaire, sur agarose 1%
Trois collections d'ADNG servent de matrice respectivement digérées par les enzymes de restrictions Dral , HpaI et SspI

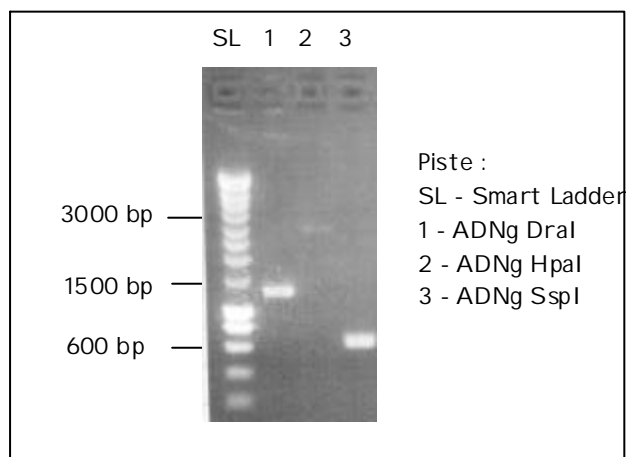


Figure 25 : Vérification de l'intégrité des fragments d'ADN obtenue le Genome Walker pour la SST (purification QIAEX II), agarose 1%

a) Ligation

La concentration des fragments d'ADN de 1300 bp purifiés a été estimée sur gel d'agarose (fig. 27). La ligation pCRI/fragments de 1300 bp a été réalisée en respectant un rapport 1/3.

b) Transformation

Les *E. coli* themocompétentes TOP10F' ont été transformées avec le produit de ligation. La sélection des transformants a été réalisée sur milieu LB avec tétracycline, ampiciline, X-gal et IPTG. Les colonies blanches ont été repiquées et criblées par PCR au moyen des amorces universelles forward et reverse M13 (fig. 27).

| | |
|------|---------------------------|
| M13F | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC |
| M13R | AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA |

Deux stock glycérol de clones positifs ont été séquencés et conservés (clones SST150011 et SST150012).

c) Séquencage

La matrice à séquencer étant relativement grande, son séquençage se fait en deux temps. Premièrement, au départ des sites M13Fw et M13Rv se trouvant sur le vecteur et déjà été utilisé lors du pré-séquencage. Deuxièmement, au départ de nouvelles amorces déterminées sur base des premières séquences obtenues :

| | |
|------------|-----------------------|
| SeqPrSSRg1 | ACCATTGTAGCTGTGGGA |
| SeqPrSSTd1 | GATATTTAATTGGAAAAGAGC |

D'après les résultats du séquençage, il apparaît que les deux fragments séquencés diffèrent par une séquence de 20 nucléotides localisée à 280 bp de l'ATG. En dehors de cette zone, le degré d'identité entre les deux séquences est très élevé. Le clone SST150012 contient une séquence de 1092 bp alors que le clone SST150011 contient un insert de 1122. La séquence isolée de 1122 bp est plus longue que celle clonée précédemment au laboratoire. Cette séquence en étant également la plus proche, c'est du clone SST150011 que dériveront les différentes constructions réalisées par la suite.

La séquence de 3000 bp (obtenue sur la collection d'ADNg restreint par HpaI) a été isolée et son analyse fera l'objet d'une étude ultérieure

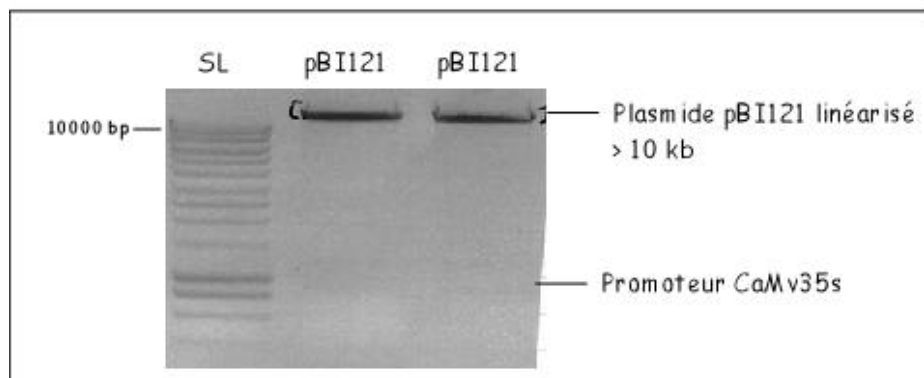


Figure 28a : Vérification de la double restriction (HindIII - XbaI) du plasmide pBI121 pour l'excision du promoteur CaMv35S.
La bande correspondant au plasmide est découpée et purifiée par QIAEX

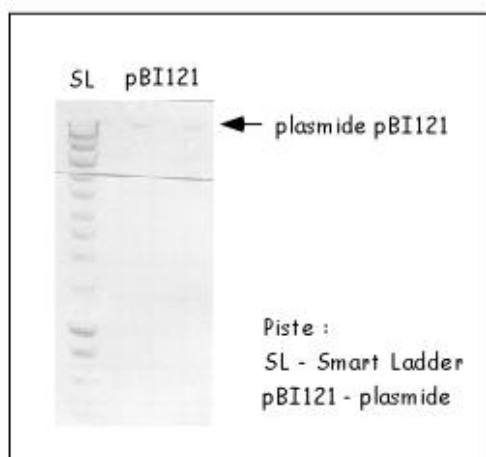


Figure 28b : Vérification sur agarose 1 % de l'intégrité du plasmide pBI121 restreint purifié par QIAEX II

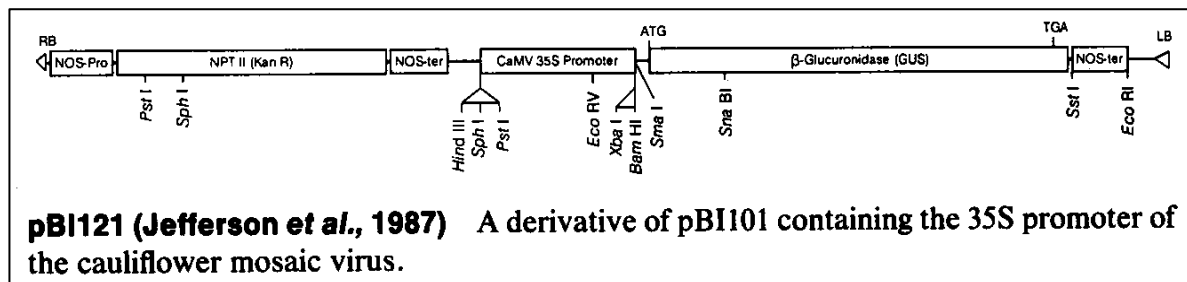
2. Délétions du promoteur

Sur base de la séquence obtenue, des fragments de plus en plus courts ont été produits par PCR en insérant des sites de restriction. Ils sont à leur tour clonés dans des vecteurs commerciaux linéarisés (pCRII - Invitrogen) prêts pour la ligation. Ils peuvent alors être multipliés en *E. coli*. Ces promoteurs de différentes tailles sont excisés pour être insérés, dans le vecteur binaire pBI121, devant le gène rapporteur GUS (?-glucuronidase). La construction ainsi réalisée est à son tour multipliée et récupérée pour transformer des *Agrobacterium tumefaciens* qui introduiront le matériel génétique dans le génome végétal (du tabac et de la chicorée).

Pour détecter les zones importantes du promoteur, nous l'avons raccourci progressivement jusqu'à ce qu'il ne soit plus fonctionnel. Les promoteurs délétés ont été obtenus par PCR. Leur activité a été testée après transformation, *in vivo*, par l'expression GUS.

2.1. Plasmide pBI121

Le plasmide pBI121 est le vecteur binaire utilisé pour tester le fonctionnement du



promoteur. Dans son T-DNA, il porte un gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur végétal NOS et le gène GUS précédé du promoteur constitutif CaMV35S. Ce dernier promoteur a été excisé pour être remplacé par le promoteur étudié.

Le plasmide pBI121 a été restreint par HindIII et XbaI. Le produit de restriction a été déposé sur gel d'agarose 1 % ; la bande d'ADN correspondant au plasmide doublement restreint (fig. 28a) a été découpée du gel et purifiée (fig 28b).

2.2. Choix des amorces pour "raccourcir" le promoteur

Des amorces ont été définies afin de synthétiser des fragments de plus en plus courts du promoteur. Six amorces ont été déterminées : une amorce droite et cinq amorces gauches. Ces amorces localisées sur les figures 29 a et b portent les sites de restriction XbaI et HindIII pour orienter l'insertion dans le plasmide pBI121 en amont du gène rapporteur GUS. En gras apparaissent les différents sites de restriction ajoutés aux amorces.

| | |
|--------------|--|
| PrCiSSTHind | AAGCTT -CGGCTTACTATAGGGCACG |
| PrCiSSTXba | TCTAGA -TTTACTGTCTAAAGGTGAGTGT |
| PrCiSst2Hind | AAGCTT -ACATCCAAATTCTAGTTTGACC |
| PrCiSst3Hind | AAGCTT -TTGTAGCTGTGGGACAATCC |
| PrCiSst4Hind | AAGCTT -ACGTTGATTTAATATTGCTTGTG |
| PrCiSst5Hind | AAGCTT -GGTAGAAAGCAATAGGCAGG |

GAATT**CGGCTTACTATAGGGCAGC**CGTGGTCGACGGCTCNGGCTGGTAAATGAAAAGAATGGGAAG
GATTTGGGTTTAAAGTATAAGTGCTTAGGTATTTAACCATAATAGTAATTTATCCCAACTAACTC
TCAATTCTCATAGAATTATGGAATTCCTTAGTTAAACCCAGATAAGTTAGTATATTAACAATTA**AG**
ATCCAAATCTAGTTTGAGCAAATTTAGTTTCAAGTCAAACCTAAGTTTCTTACTTGGCACATTTG
GTCCCTTAAATATTCAAATACTAGAAATATACCTTTTGAGGTAGAAAAACAAAGTGGGTCGGAGAT
GAACCATGTACTACATCATTTTTTACTCAAAAAATTGAGTAAAAAATGAATGTGAGTTGGAGATGA
TCTGACCA**TTGTAGCTGTGGGACAATCC**ACAATCCCTTGGGCTATTCAAATATATATGAAGATCTT
GGAATCTCATAGATGTTCCAAATTCAGAATACGTATATTGGATTTTAATTTACATTATTGTATTTT
ACACAACCTATTCTATATAGTTATATATGACTTAACATTATTTGATTATACCTACTCATCACATA
AGAAATCTAAACACAAGTGACTTTTACGCTACAAAATTTTCATGATAATATTTTTGAAAATATGG
ACGTTGATTTAATATTGCTTGTGTTAAAAGATGTAGAACAGAATTACTTTATATACGATACAAACC
CAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAACATACACTTGATACAC
GGCATAACGGACACAAAAATACACGGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGT**GG**
TAGAAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAAATATCTATTTCATTTTTTTTATT
TTTAATTTT**CGTT**CGTTTATAGTACTTTAAT**AGT**CCGGTTTATTACGATGTCTGAAGAGAAA
AAACAAGTGTCACTTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATCTATAAAAACTCCATTAAATC
ACCCCTTACCA**CACTCACCTTTAGACAGTAAAGT**GTGCGTAGTAGAGAGACCACCCCA**ATG**GCTT
CCTCTACACCGCCACACCCCTCTCATCTCCGTGATGAGACTCAAATCTGCCCAACTAGCCG
GATCTCCGGTGGGTGGCGTTTATCCATGGCCAATGTCCTTCCGGGATCCTCGTTTTCGTCTTG
TCATCTGTGTTCTGGTTGCTGTATCCAMRCCGAATTCACAACAAATATGGCGACCAACAACCA
TCAGGGGAGAGATAAAACCCACCTCCGCCGCCACGTTTACAGCTCCGTTGCTACAAGTTGATCTCAA
ACGGGTTCCCGGAAAGTTGGAATCCAATGCTGATGTGAGTGGAACGCTCAGCTTACCATTTTCA
ACCCGATAAGAATTTTCATCAGCGATCCTGATGGTCCAATGTATCACATGGGGTGGTACCATCTCTT
CTACCAATACAACCCAGAATCAGCCATATGGGGCAACATCACATGGGGCCACTCCGTATCACGAGA
CATGATCAACTGGTTCCATCTCCCATTCGCCATGGTCCCGGACCATTTGTTACGACATCGAAGGGGT
CATGACCGGATCCGCCACAGTACTCCCCAACGGTCAGATCATGCTCTACACTGGCAACGCGTA
CGATCTCTCCAGTTACAGTGCTTAGCATACGCCGTCAACTCATCTGATCCTCTCTCTTCTGGAATG
GAAAAAGTACGAAGGAAACCAATTTTGTCCACCGCCTGGTGTGGGATACAAAGATTTTCGAGA
TCCATCCACATTATGGATGGGTCTGATGGGGAATGGAGAATGGTAATGGGGTCCAAACACAATGA
AACTATTGGTTGTGATTGTTTACCGTACTACTAATTTTACGCATTTTGAACGTGAACGAGGAGGT
ACTCCACGCGAGTCCCCATAGTGGTATGGGGAATGTGGAACCTATACCTGTGTCCACCACGCA
CACGAATGGGTGGACATGAAGGATAATGGGCCGAATGTTAAATATATTTTGAACAAAGTGGAGA
CGAAGACCGACATGATTGGTATGCGGTGGAACTTTTGACCTGAGAAAGATAAGTGGTACCCTGA
CGAGGATAGGATGCGAGATTTGGGATGAGATACGACTACGGAAAGTTCTATGCGTCAAAGAC
ATTTTATGACCAACATCAAAAGCGGAGGGTACTTTGGGGTTATGTTGGTGAAACCGACCCCCCTAA
GTCCGATCTTTTAAAGGGATGGGCTAACATCTTGAATATCCCAAGGTCCGTGTTTTGGACACGCA
AACCAGGAACCAATTTGATTCAATGGCCGATTGAAGAAGTAGAAAAATTGAGATCAACAAAATATGA
CGAATTCAAAGACGTGGAGCTCCGACCCGATCACTCGTTCCCTCGAAATTGGCACAGCGACACA
GTTGGACATAAGATGCGACATTTGAAATCGATCAAAAGAAGTTACAATCAACGCTTGAAGCCGATGT
TTTGTTCAACTGTACAACCTAGCGAGGGTTCAGTCGGGAGGGGTGTGTTGGGACCATTGGAATCGT
GGTTCTAGCGGATGCCAACCGCTCTGAGCAACTTCTGTGTATTTCTATATTGCAAAAGACACCGA
TGGAACCTCAAAAACCTACTTCTGTGCTGATGAATCAAGGTCATCGACGACAAAGACGTTGGAAA
ATGGGTATACGGAAGCAGTGTTCTGTTCTTGGAGGTGAAAATTACAACATGAGGTACTGGTGGA
TCATTTCGATAGTGAAGGGTTCGCACAAGGAGGAAGAACGGTGGTGACATCAAGAGTGATCCCCAC
GAAGGCCATCTATGGCGCTGCTAAGATATTTTGTTCACAACGCCACCGGAATTAGCGTCAAGGT
ATCTCTCAAGATCTGGAAATGGCGGAAGCACAACTCGATCCATTCCCTCTTTCTGGGTGGAGTTC
TTGATTATTAGAATTCGTATCCCTCTCTATTTGTGTGTTATTGTTGTGAAATATGGTAGCATGAT
TGCGGGTTTAGTGGGGTATTATGGTAGTTTGTAAATGGTGGTTGTGGTACTGCATTTGTGAGATT
ATAAATTGAATTGTTATTCCTGTTTACAACCTTTCTAAGCAAATGGTATGTCATGTTTTGATC

Amorces **PrCisST Hind** et **FpCiPrSST01g**
Amorces **FpCiPrSST02g**
Amorces **FpCiPrSST03g**
Amorces **pCiPrSST04g** et **FpCiPrSST04d**
Amorces **FpCiPrSST05g**
Amorce **PrCisSTXba**

Figure 29a : Localisation des différentes amorces dans le promoteur de la SST (en rouge) suivi de la séquence codante de la SST (en noir)

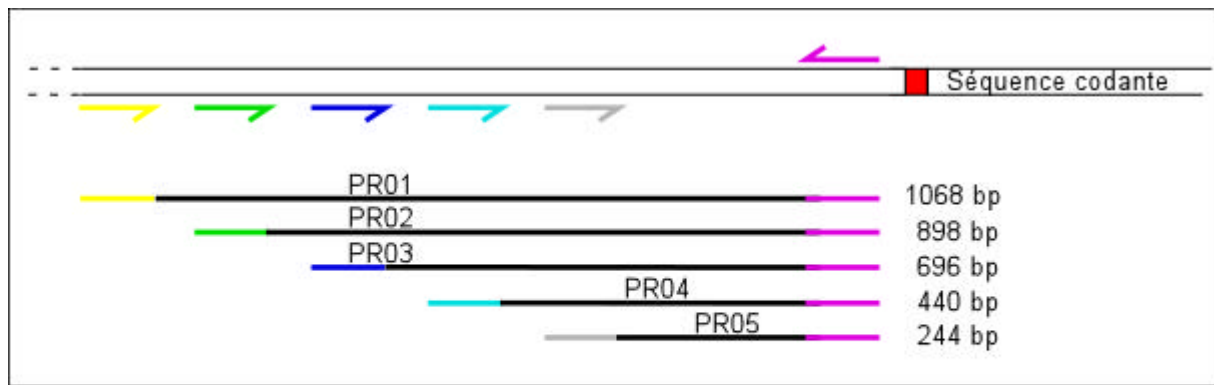


Figure 29b : Localisation schématique des amorces utilisées pour la synthèse des fragments de promoteur
 Les couleurs utilisées correspondent à celles de la figure 33a

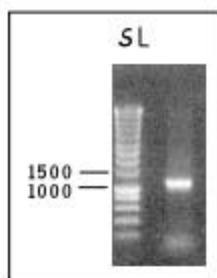


Figure 30a : Amplification du promoteur complet de la SST avec sites de restriction XbaI et HindII

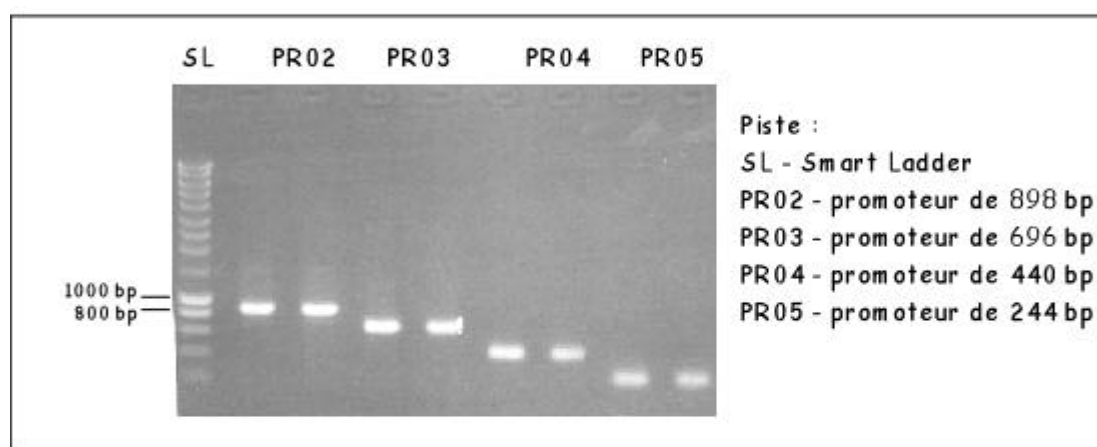


Figure 30b : Amplification de fragments raccourcis du promoteur de la SST, avec sites de restriction XbaI et HindIII.
Les appellations PR02 à PR05 sont les noms donnés aux quatres promoteurs réduits (du plus grand-898 bp au plus court-244 bp)

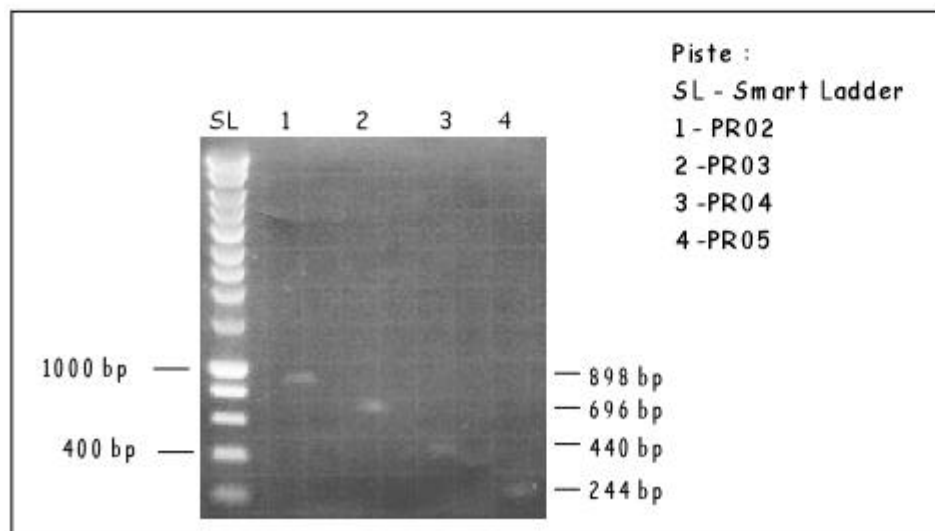


Figure 30c :Vérification sur agarose 1 % de l'intégrité des amplicons de réduction du promoteur, avec sites de restriction, purifiés par QIAEX II

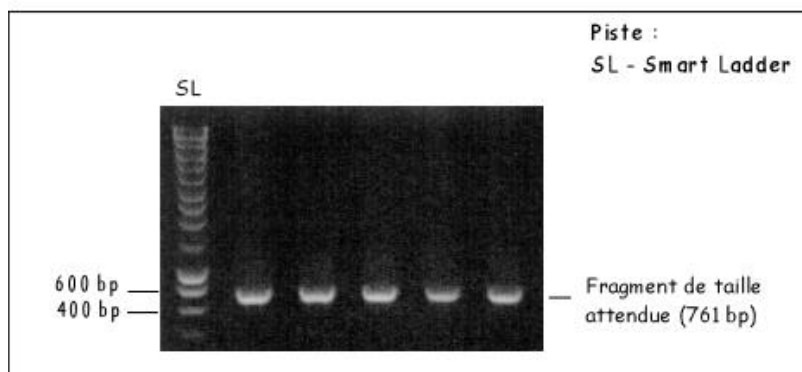


Figure 31a : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSst02g et FpCiPrSst04d) des colonies transformées par le vecteur pCRII contenant le fragment du promoteur de la SST (PR01) de 1122 bp

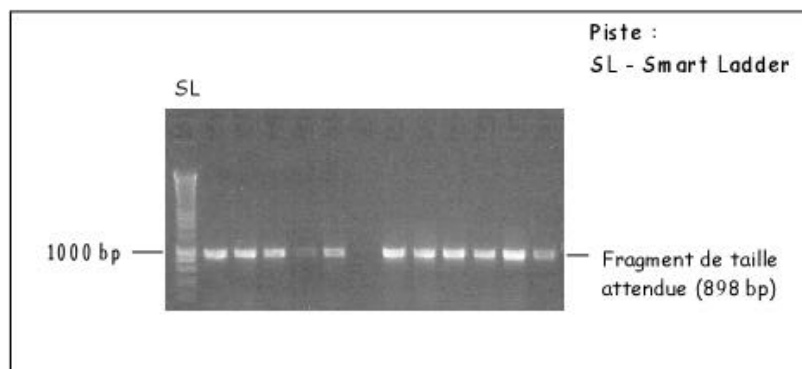


Figure 31b : Criblage par PCR (amorces PrCiSstXbaI et FpCiPrSst02g) des colonies transformées par le vecteur pCRII contenant le fragment du promoteur de la SST (PR02) de 894 bp

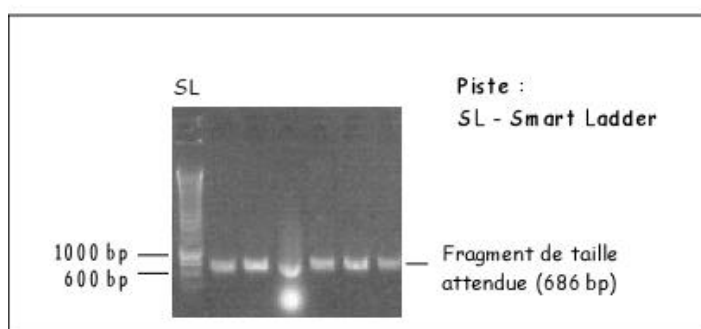


Figure 31c : Criblage par PCR (amorces PrCiSstXbaI et FpCiPrSst03g) des colonies transformées par le vecteur pCRII contenant fragment du promoteur de la SST (PR03) de 696 bp

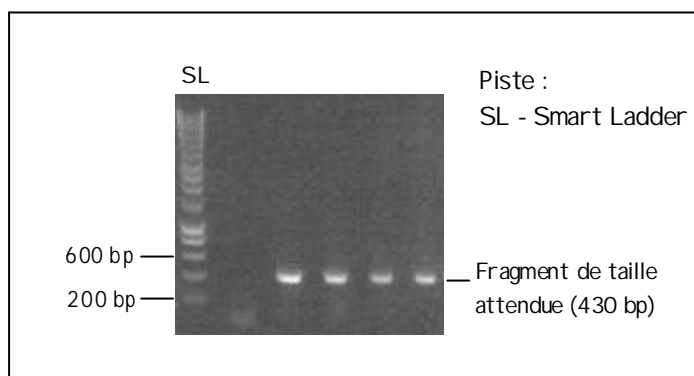


Figure 31d : Criblage par PCR (amorces PrCiSstXbal et FpCiPrSst04g) des colonies transformées par le vecteur pCRII contenant le fragment du promoteur de la SST (PRO4) de 440bp

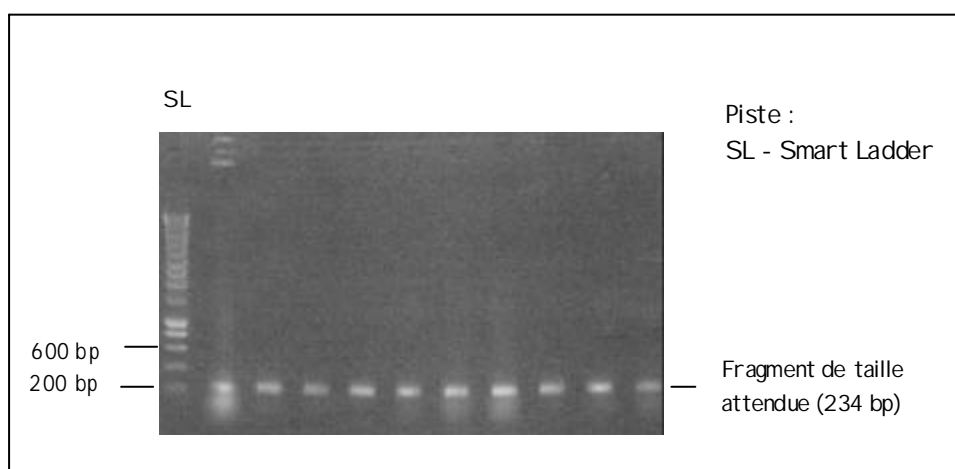


Figure 31e : Criblage par PCR (amorces PrCiSstXbal et FpCiPrSst05 g) des colonies transformées par le vecteur pCRII contenant le fragment du promoteur de la SST (PRO5) de 244bp

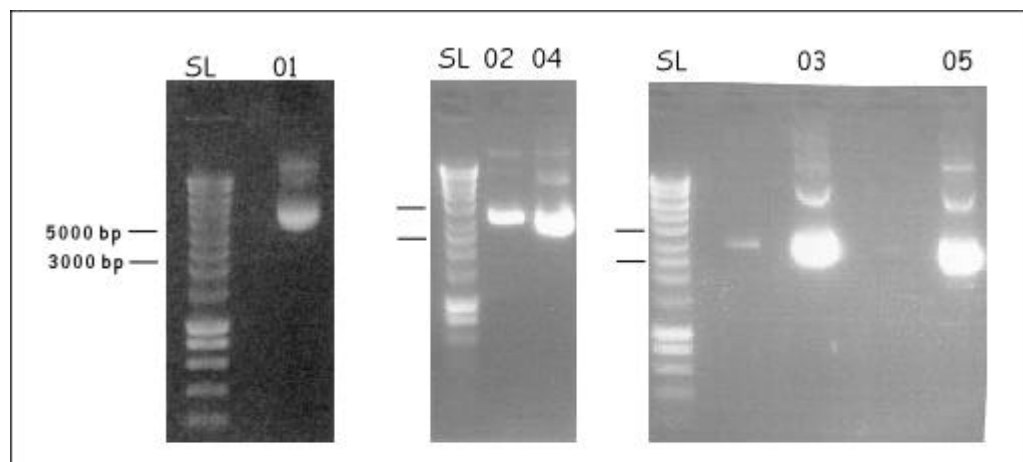


Figure 32 : Vérification de l'intégrité des plasmides pCRII + PR01(à 05) issus de midipréparation plasmidique.

Piste :

SL - Smart Ladder

01 - pCRII + promoteur de 1068 bp (PR01)

02 - pCRII + fragment de 898 bp du promoteur (PR02)

03 - pCRII + fragment de 696 bp du promoteur (PR03)

04 - pCRII + fragment de 440 bp du promoteur (PR04)

05 - pCRII + fragment de 244 bp du promoteur d (PR05)

2.3. Clonage des "promoteurs tronqués"

a) Clonage dans pCRII

Les "amplifications de réduction" du promoteur de la SST se font sur l'ADN plasmidique provenant du clone SST150011 (40 cycles à 55°C) (fig. 30a et 30b). Les fragments de promoteur SST ont été amplifiés au départ d'ADN plasmidique du clone SST150011.

Les promoteurs "raccourcis" ont été excisés puis purifiés par la méthode QIAEX II avant d'être ligués en respectant le rapport insert/vecteur = 3 (fig. 30c).

b) Construction pCRII en TOP10F'

Le mélange de ligation a été utilisé pour transformer des *E. coli* TOP10F'. La sélection des transformants a été réalisée sur milieu LB contenant les antibiotiques de sélection tétracycline et kanamycine, ainsi que de l'IPTG et du X-gal. Les colonies blanches ont été criblées au moyen d'amorce commune en 3' (PrCiSstXbaI) et d'autre part une amorce spécifique du fragment en 5' :

| | |
|-------------|-------------------------|
| FpCiPrSST2g | ACATCCAAATTCTAGTTTGACC |
| FpCiPrSST3g | TTGTAGCTGTGGGACAATCC |
| FpCiPrSST4g | ACGTTGATTTAATATTGCTTGTG |
| FpCiPrSST5g | GGTAGAAAGCAATAGGCAGG |

La construction contenant le promoteur entier (PR01) a été contrôlée avec la paire d'amorce FpCiPrSst02g/FpCiPrSst04d.

| | |
|-------------|-------------------------|
| FpCiPrSST4d | ATTAAAGTACTAAACCATGAACC |
|-------------|-------------------------|

Ces amorces sont de même séquence que celles utilisées pour introduire les sites de restriction à chaque extrémité du promoteur. Les amplifications sont réalisées en 35 cycles à 55°C. (fig. 31a à 31e, à titre indicatif).

Des stocks glycérols et des midi-préparations d'ADN plasmidiques ont été constitués au départ d'un clone de chaque transformation.

Des gels d'agarose permettent de vérifier l'intégrité des plasmides isolés (fig. 32).

c) Construction pBI121 en DH10B

Les promoteurs raccourcis bordés des sites de restrictions ont été récupérés par double restriction XbaI/HindIII au départ des plasmides pCRII correspondant (fig. 33a et 33b).

| Promoteur | Taille |
|----------------------------|---------|
| PR01 (fragment complet) | 1068 bp |
| PR02 | 898 bp |
| PR03 | 696 bp |
| PR04 | 440 bp |
| PR05 | 244 bp |

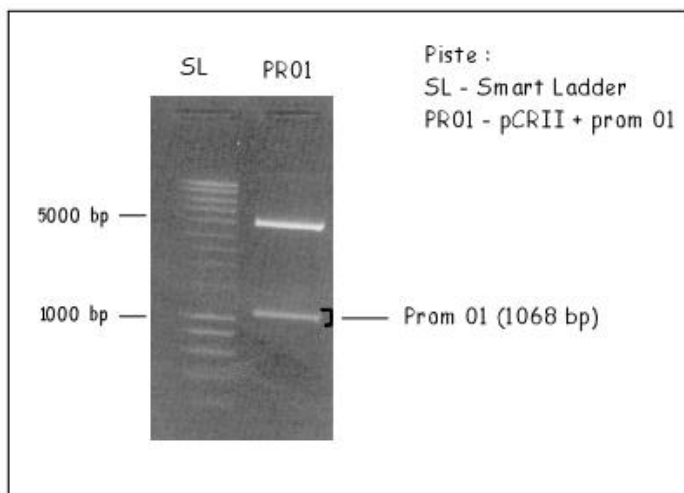


Figure 33a : Vérification sur agarose 1 % de la double restriction (HindIII - XbaI) du plasmide pCRII contenant le promoteur complet (1068 bp). La bande du promoteur excisé est découpée du gel

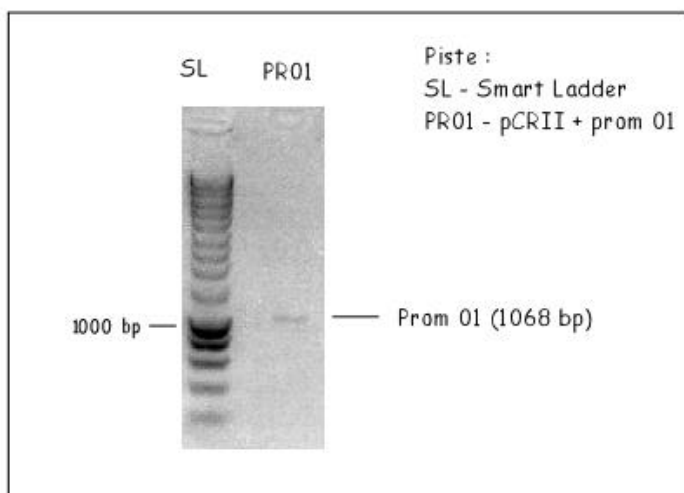


Figure 33c : Vérification de la qualité des promoteurs excisés de pCRII et purifiés par Ultra-free Centrifugal Filter Device, sur agarose 1 %

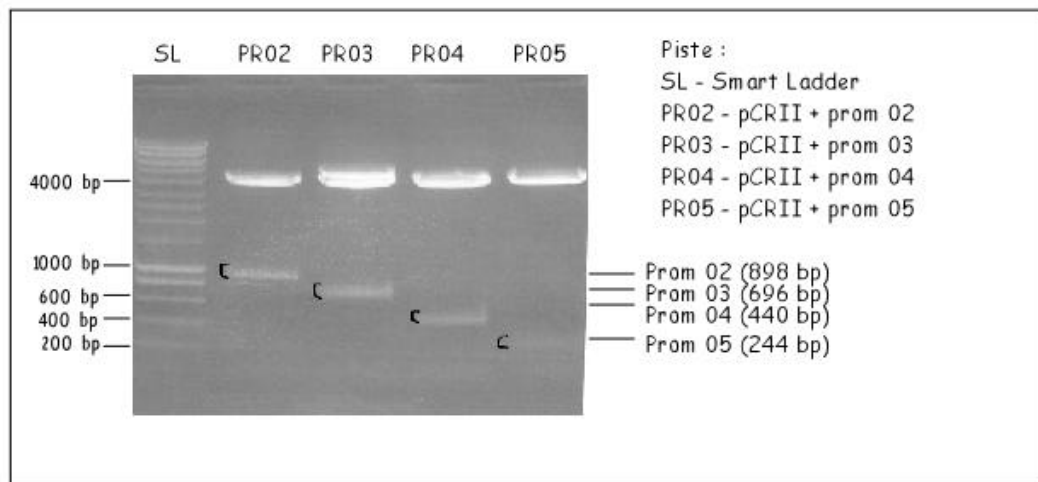


Figure 33b : Vérification de la double restriction (HindIII - XbaI) du plasmide pCRII contenant les promoteurs SST tronqués, sur agarose 1 %
Les bandes d'ADN des promoteurs tronqués ont été découpées du gel

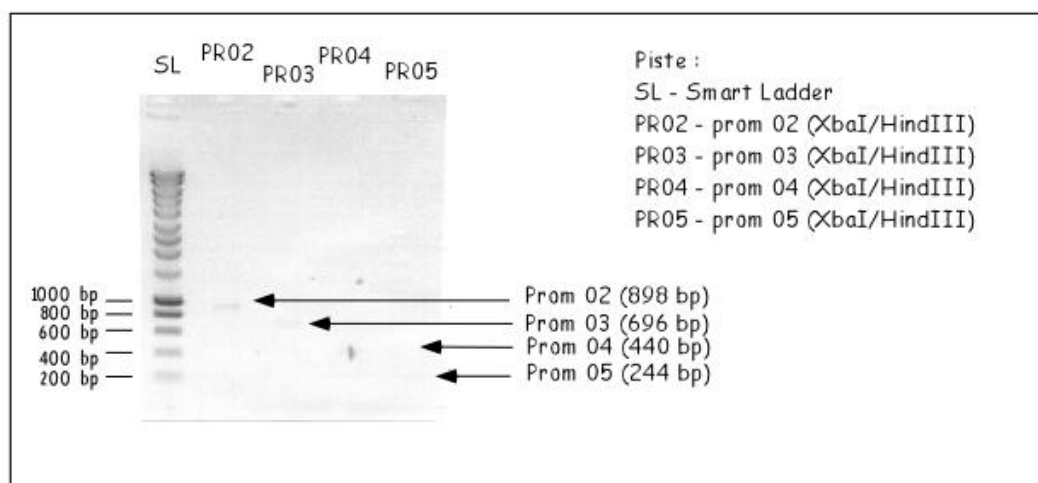


Figure 33d : Vérification de la qualité des promoteurs excisés de pCRII et purifiés par Ultra-free Centrifugal Filter Device, sur agarose 1 %

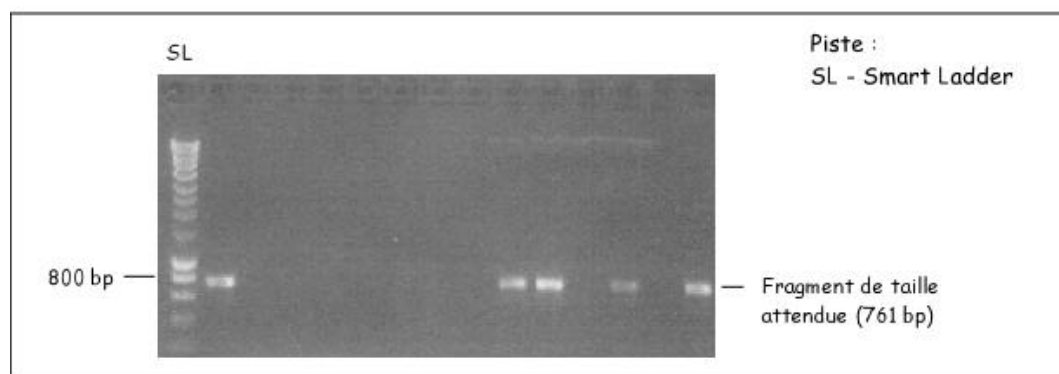


Figure 34a : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSst02g et FpCiPrSst04d) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121 contenant le promoteur de la SST (PR01) de 1068 bp

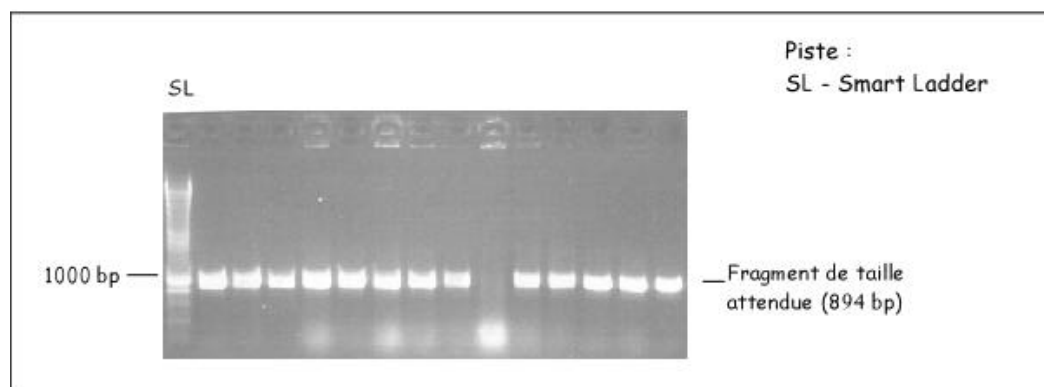


Figure 34 a : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSst02g et FpCiPrSst04d) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121 contenant le promoteur de la SST (PR01) de 1068 bp

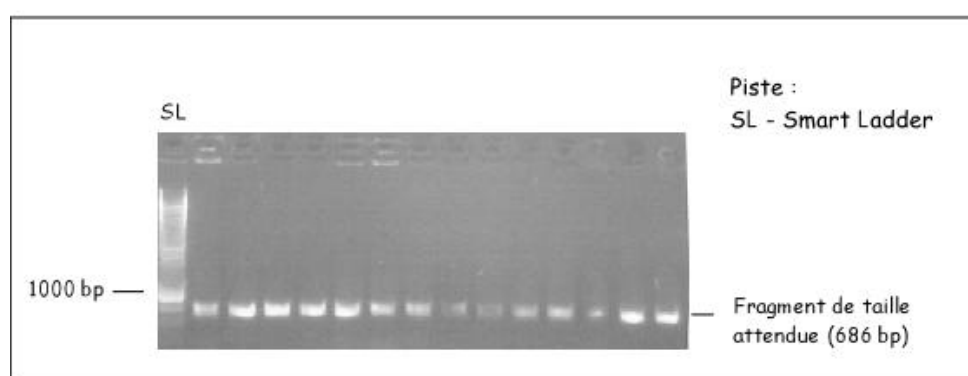


Figure 34c : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSstXbaI et FpCiPrSst03g) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121 contenant le promoteur de la SST (PR03) de 696 bp

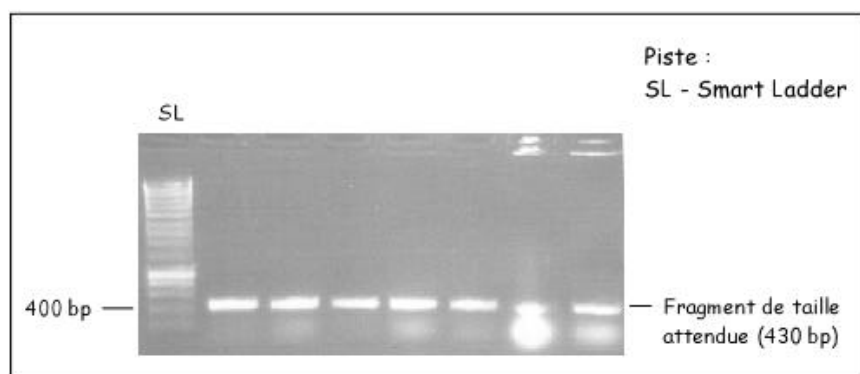


Figure 34 d : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSstXbaI et FpCiPrSst04g) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121 contenant le promoteur de la SST (PR04) de 440 bp

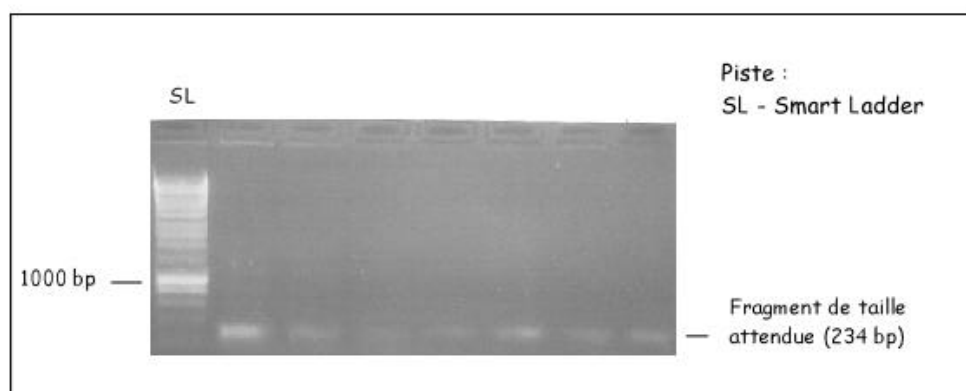


Figure 34 e : Criblage par PCR (amorces FpCiPrSstXbaI et FpCiPrSst05g) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121 contenant le promoteur de la SST (PR05) de 244 bp

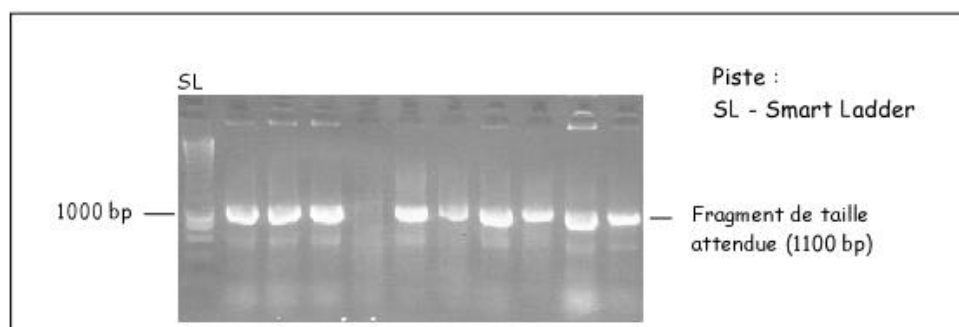


Figure 34 f : Criblage par PCR (amorces Gusg et Gusd) des colonies DH10B transformées par le vecteur pBI121

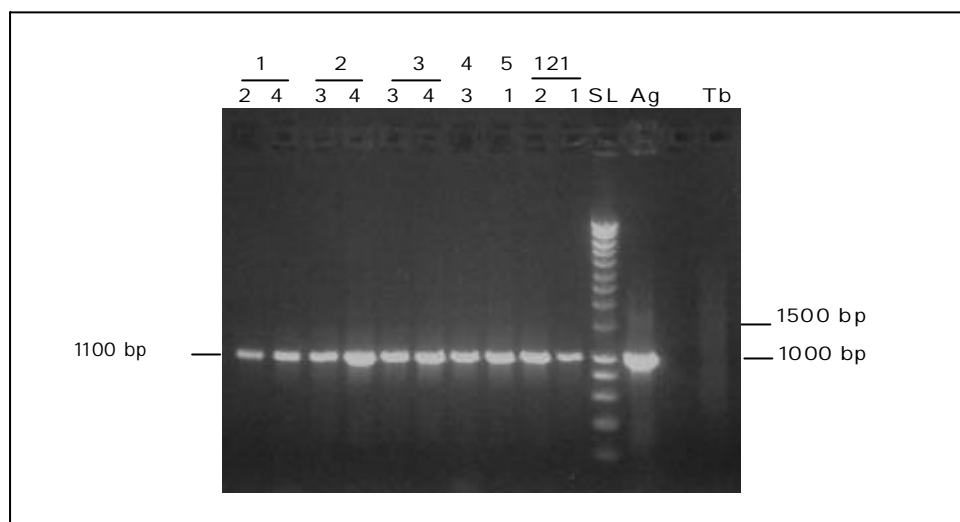


Figure 35 : Test d'intégration du T-DNA dans les plants transformés par amplification Gusg-Gusd

SL : Smart Ladder

1-2 et 1-4 : construction contenant PR01

2-3 et 2-4 : construction contenant PR02

2 et 1-4 : construction contenant PR03

1-2 et 1-4 : construction contenant PR04

1-2 et 1-4 : construction contenant PR05

1-2 et 1-4 : construction contenant pBI 121

Ag : *Agrobacterium* transformé avec la construction PR01

Tb : ADNg de tabac non transformé

Les fragments de promoteur purifiés (fig. 33c et 33d) ont été introduits dans le plasmide pBI121 en amont du gène rapporteur GUS. Ces vecteurs de grande taille sont introduits dans les bactéries électrocompétentes DH10B (Gibco). La sélection des transformants a été réalisée sur milieu LB contenant l'antibiotique de sélection, la kanamycine. Les colonies blanches ont été criblées au moyen des amorces et du programme d'amplification décrits pour le criblage pCRII (fig. 34a à 34f, à titre indicatif).

Des stocks glycérol et des midi-(ou maxi-) préparations d'ADN plasmidique ont été constitués au départ d'un clone de chaque transformation. Des gels d'agarose permettent de vérifier l'intégrité des plasmides isolés.

d) Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Les plasmides contenant les promoteurs de différentes tailles en amont du gène GUS ont été utilisés pour transformer des *Agrobacterium tumefaciens* (souche LBA4404 pBR9MCS5 **vir**GN54, voir annexe 1) électrocompétentes. Une transformation contrôle a également été réalisée avec le plasmide pBI121 contenant le promoteur CaMV35S. La sélection des transformants a été réalisée sur milieu LB contenant les antibiotiques de sélection, kanamycine, rifampicine, gentamycine et streptomycine. Les colonies ont été criblées au moyen des amorces GUSg et GUSd (35 cycles à 55°C).

| | |
|------|-------------------------|
| GUSd | CGTCACCGAGGCTGTCGACGA |
| GUSg | GGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAA |

L'amplicon attendu a une taille de 1100 bp (fig 35). Pour chaque transformation, un clone positif a été conservé sous forme de stock glycérol.

3. Culture *in vitro* et transformation de végétaux

Deux cents akènes de chicorée *C. intybus* var. Madona (Warcoing S.A.) et 30 akènes issus de l'autofécondation de plants 97TM17-03 (Warcoing S.A.) ont été stérilisés. Les plants 97TM17-03 appartiennent à la même lignée que ceux utilisés lors de l'étude des variations du niveau de transcrits pour la SST et la FFT. Cependant, le taux de germination de ces akènes après stérilisation est faible (17 %) alors qu'il est de 76.7 % pour le cultivar Madona. Cette grande différence s'explique par le fait que Madona est une variété où les akènes sont triés mécaniquement selon des critères de volume et de poids pour être commercialisés, alors que les akènes déjà agés 97TM17-03 proviennent simplement d'une récolte après floraison non sélective.

L'étude du promoteur *in vivo* a donc eu lieu dans les plants Madona pour lesquels la quantité de matériel de départ n'est pas limitante; ce qui n'est pas le cas de la variété 97TM17-03 pour laquelle seules quatre plantules ont pu être obtenues. Des transformations contrôles seront effectuées en parallèle sur des plants de tabac conservés en conditions stériles au laboratoire (URBV).

Des feuilles de chicorée et des feuilles de tabac ont été transformées au moyen d'*Agrobacterium* avec les plasmides suivants : PR01, PR02, PR03, PR04, PR05 et pBI121 utilisé comme contrôle de transformation

3.1. Analyse des constructions

En raison du temps limité dont nous disposions pour réaliser ce travail et de la lenteur de croissance des régénérants, les transformations ont été réalisées dès l'obtention des constructions, avant même séquençage. Les PCR de criblage (*Agrobacterium*/pBI121-délétion-GUS) étant apparemment en adéquation avec les tailles attendues, aucune contre-indication ne semblait exister.

Les cinq constructions obtenues ont fait l'objet d'un séquençage limité aux zones de jonction entre les délétions du "promoteur" et le gène GUS. Pour le séquençage des constructions Pr01 à Pr04, la paire d'amorces FpCiPrSst04g et GUSd (caractéristiques en annexe 2) a été utilisée. FpCiPrSst04g est localisée à 464 bp en 5' de l'ATG du gène GUS (440 bp de l'amorce au site *Xba* I du MCS et 24 bp supplémentaires jusqu'à l'ATG). GUSd est quant à elle localisée à l'extrémité 3' du gène GUS entre 1839 et 1860 bp. La taille attendue de ce fragment est de 2328 bp. Une troisième amorce (pBI121g) est utilisée pour séquencer la zone de jonction de GUS avec le plus petit fragment de promoteur (PR05). Cette démarche a été préférée à l'utilisation de l'amorce FpCiPrSst05g ayant servi à la génération du fragment de promoteur de 244 bp, les 150 à 200 premières bases d'un fragment ne pouvant être séquencées correctement. Il était donc indispensable de commencer le séquençage en amont, sur le T-DNA. Cette amplification a été réalisée avec le couple d'amorces pBI121g et GUSd. L'amplicon obtenu est, conformément aux résultats attendus, d'une taille de 2171 bp

| | |
|--------------|-------------------------|
| FpCiPrSst04g | ATTAAAGTACTAAACCATGAACC |
| GUSd | CGTCACCGAGGCTGTAGCCGA |
| pBI121g | CAATTTCACACAGGAAACAGC |

Les séquences des 5 jonctions obtenues ont été alignées à l'aide du logiciel Vector Nti V7.0 (Informax Inc.). La figure 36 illustre cet alignement.

Il en ressort que les jonctions sont correctement effectuées pour les constructions Pr01 (1068 bp), Pr02 (898 bp) et Pr04 (440 bp). On observe cependant que pour Pr03 (696 bp) et Pr05 (244 bp) un fragment inattendu est présent entre le fragment raccourci inséré et le gène GUS. Ce fragment est identique dans les deux constructions et n'appartient ni à pBI121 ni à une région du "promoteur" isolé. Il apparaît que ce fragment de 56 bp positionné à 24 bp de l'ATG possède à ses deux extrémités le site de restriction *Xba* I. Une recherche d'homologie dans les banques de données a fourni le résultat présenté en figure 37. Diverses origines sont proposées dont celle du gène codant pour un ARN 16S de bactérie et un vecteur de clonage différent de celui que nous

Figure 66. Augmentation des séquences des

| PR01-Gus | (1) | -----TATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | 121 | 240 |
|-----------|-------|--|-----|-----|
| PR02-Gus | (1) | -----AGNNNANCAGAATTACTTTATATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | | |
| PR03-Gus | (1) | -----TTATATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | | |
| PR04-Gus | (1) | GCCTTCCTTNNACNNNCCAGATTACTTTATATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | | |
| PR05-Gus | (1) | -----TTATATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | | |
| Consensus | (1) | TTATATACGATACAAACCCAATACATACACATCCAAAGACATACACACAAGACAAACCAATACATAAAACATACACTGATACACGCATACGACA | | |
| PR01-Gus | (91) | CAAAATACACGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGTGGTAGAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| PR02-Gus | (111) | CAAAATACACGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGTGGTAGAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| PR03-Gus | (94) | CAAAATACACGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGTGGTAGAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| PR04-Gus | (121) | CAAAATACACGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGTGGTAGAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| PR05-Gus | (1) | -----GATTGCGCCTCCCAATANACCCNCCCTTGGTAGAA--AAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| Consensus | (121) | CAAAATACACGCACATAGTATACATGCAACATGTTAAACCATATATTTGTGGTAGAAGCAATAGGCAGGTTTATGCTCTTTTCCAATTAATATCTATTTCATTTTTTTATTTTTTATTTT | | |
| PR01-Gus | (211) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| PR02-Gus | (231) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| PR03-Gus | (214) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| PR04-Gus | (241) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| PR05-Gus | (99) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| Consensus | (241) | TAATTTTCGGTTCATGGTTTAGTACTTTAATTAGTCCGGTTATTTACGATGTCTGAAGAGAAAAAACAAGCTGTCACCTTTCATGTATGGAAGTATCTGTATTAAAAATTCATAAAAAAC | | |
| PR01-Gus | (331) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGA-----GGATCCCCGGGTGGTC | | |
| PR02-Gus | (351) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGA-----GGATCCCCGGGTGGTC | | |
| PR03-Gus | (334) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGAAG-GCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTC | | |
| PR04-Gus | (361) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGA-----GGATCCCCGGGTGGTC | | |
| PR05-Gus | (219) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGAAGGCCGAATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGATCCCCGGGTGGTC | | |
| Consensus | (361) | TCCATTAATCACCCCTTACCACACTCACCTTTAGACAGTAAATCTAGA-----GGATCCCCGGGTGGTC | | |
| PR01-Gus | (395) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| PR02-Gus | (415) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| PR03-Gus | (453) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| PR04-Gus | (425) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| PR05-Gus | (339) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| Consensus | (481) | AGTCCCTTATGTTTACGTCCTGTAGAAACCCCAACCCGTGAAATCAAAAAACTCGACGGCCTGTGGGCATTTCAGTCTGGATCGCGAAAACTGTGGAATTGATCAGCGTTGGTGGGAAAGCG | | |
| PR01-Gus | (515) | CGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACACN----- | | |
| PR02-Gus | (535) | CGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGNNNTAAC----- | | |
| PR03-Gus | (566) | ----- | | |
| PR04-Gus | (545) | CGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAG-CAGTTTTAAC----- | | |
| PR05-Gus | (459) | CGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAACGATCAGTTTCGCCGATGCAGATATTCGTAATTATGCGGGCAACGCTCTGGTATCAANCGCGAAGNCTTTATACCGA | | |
| Consensus | (601) | CGTTACAAGAAAGCCGGGCAATTGCTGTGCCAGGCAGTTTTAAC | | |
| PR01-Gus | (564) | ----- | | |
| PR02-Gus | (580) | ----- | | |
| PR03-Gus | (566) | ----- | | |
| PR04-Gus | (589) | ----- | | |
| PR05-Gus | (578) | AAGGTTGGGCAGGCCANCGTA | | |
| Consensus | (721) | 741 | | |

avons utilisé. Ce fragment étant très court, il est difficile de se prononcer quant à son origine exacte. On peut cependant poser l'hypothèse qu'il proviendrait d'une contamination des plasmides pBI121 par de l'ADN génomique bactérien lors de leur isolement (maxiprep). On peut vraisemblablement penser qu'il aura été digéré en même temps que pBI121 et intégré lors de la ligation des divers "promoteurs". Il nous faut tenir compte de cette insertion malheureuse lors de l'analyse et de la discussion des résultats des tests GUS.

3.2. Analyse des Plants régénérants

Au terme de ce mémoire, il apparaît que l'ensemble des tissus transformés à l'aide des six constructions (5 délétions et 1 contrôle positif CaMV-GUS) a pu régénérer des cals, tant pour le tabac que pour la chicorée. Cependant, la régénération de plantules est un processus lent et nécessitant un temps variable en fonction de l'espèce transformée. De ce fait, nous ne disposons que de quelques plants suffisamment développés pour permettre de procéder à l'évaluation des constructions. Les transformations réalisées sur tabac ont régénéré de manière satisfaisante pour chacune des transformations ce qui n'est pas le cas de la chicorée pour qui les plantules sont encore trop petites pour être analysées sans risquer de perdre l'échantillon. Nous réaliserons donc l'ensemble des tests sur tabac. Pour ce faire, sur l'ensemble des transformants, 20 plants ont été isolés.

Les tests auxquels nous avons procédé sont de plusieurs ordres: premièrement des tests histochimiques par coloration GUS visant à démontrer l'activité glucuronidase chez les plants transformés. Ensuite, des tests PCR réalisés sur l'ADN génomique de 10 des 20 plants de tabac, permettront d'attester la présence des constructions au sein de l'ensemble des plants, et ce y-compris chez ceux pour lesquels aucune activité GUS n'aurait pu être détectée. Le choix des plants sera fait sur base des résultats obtenus lors du test GUS. Afin de pouvoir corrélérer de manière certaine les résultats obtenus par les deux approches, une feuille unique sera prélevée sur chacun des plants; la moitié servira aux colorations GUS et l'autre permettra l'extraction de l'ADN génomique qui sera utilisé pour les amplifications.

a) Tests histochimiques

Le test GUS permet de détecter les conditions dans lesquelles est exprimé un gène ainsi que la localisation de cette expression. Dans le cas qui nous intéresse, seule l'expression, la variation, ou l'absence d'expression nous intéresse puisque nous ne travaillons pas encore dans l'espèce étudiée. Suite à des tests préliminaires réalisés sur des plants de tabac transformés Pr01 (1068 bp), il s'est avéré que l'expression du gène GUS, sous contrôle du "promoteur" de la SST de chicorée, se fait principalement au niveau de poils glandulaires présents en abondance sur la surface de l'épiderme des feuilles de tabac. Ceci est étonnant puisque dans la chicorée la SST est produite dans les racines. Cette première constatation nous permet de conclure que le fragment de 1068 bp se trouvant en amont de l'ATG de la SST de chicorée est suffisant pour contrôler

Figure 37 : Blast réalisé sur l'insertion de 56nucléotides dans les constructions PR03 et PR05

| Sequences producing significant alignments: | | (bits) | Value |
|--|--------------------------------------|---------------------|-------|
| gi 19352323 gb AF335419.2 | Cloning vector pPGKneo-I, comple... | 111 | 6e-23 |
| gi 19033281 gb AY049206.1 | Tomato chlorotic mottle virus is... | 111 | 6e-23 |
| gi 8131761 gb AF144029.1 F144014S16 | Homo sapiens MDM2 gene,... | 111 | 6e-23 |
| gi 8131760 gb AF144028.1 F144014S15 | Homo sapiens MDM2 gene,... | 111 | 6e-23 |
| gi 17017095 gb AF438072.1 AF438072 | Harpaline sp. KAO-2001 2... | 111 | 6e-23 |
| gi 4139161 gb AF095853.1 AF095853 | Homo sapiens asthmatic cl... | 111 | 6e-23 |
| gi 15679906 gb AF043136.2 AF043136 | Uncultured Nitrosomonas ... | 111 | 6e-23 |
| gi 6649866 gb AF015282.1 AF015282 | Mus musculus MHC class II... | 111 | 6e-23 |
| gi 3411025 gb AF018044.1 AF018044 | Uncultured bacterium 1A 1... | 111 | 6e-23 |
| gi 17932873 emb AJ422110.1 PFA422110 | Plasmodium falciparum ... | 111 | 6e-23 |
| gi 3445216 gb AC005501.1 AC005501 | Mus musculus Clone pad69,... | 111 | 6e-23 |
| gi 5052352 gb AF135422.1 AF135422 | Homo sapiens GDP-mannose ... | 111 | 6e-23 |
| gi 4583154 gb AF108212.1 AF108212 | Amoeba proteus symbiotic ... | 111 | 6e-23 |
| gi 4103541 gb AF024627.1 | Picea jezoensis internal transcri... | 111 | 6e-23 |
| gi 3551859 gb AF076035.1 AF076035 | Haemophilus influenzae 16... | 111 | 6e-23 |
| gi 3411036 gb AF018055.1 AF018055 | Uncultured bacterium OS9B... | 111 | 6e-23 |
| gi 3411035 gb AF018054.1 AF018054 | Uncultured bacterium OS9E... | 111 | 6e-23 |
| gi 3411034 gb AF018053.1 AF018053 | Uncultured bacterium OS9F... | 111 | 6e-23 |
| gi 3411033 gb AF018052.1 AF018052 | Uncultured bacterium OS9C... | 111 | 6e-23 |
| gi 2921301 gb AF033115.1 AF033115 | Mus musculus proapoptotic... | 111 | 6e-23 |
| gi 2613058 gb AF030056.1 AF030056 | Babesia bovis strain S2P ... | 111 | 6e-23 |
| gi 2815617 gb AF029692.1 AF029692 | Papio hamadryas plasminog... | 111 | 6e-23 |
| gi 2613068 gb AF030061.1 AF030061 | Babesia bovis strain Ur r... | 111 | 6e-23 |
| gi 2407319 gb AF018071.1 AF018071 | Homo sapiens D15S1506 ca ... | 111 | 6e-23 |
| gi 18148974 dbi AB064705.1 AB064705 | Uncultured bacterium ge... | 111 | 6e-23 |

Alignments

>[gi|15679906|gb|AF043136.2|AF043136](#) Uncultured Nitrosomonas A17K small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 1340
Score = 111 bits (56), Expect = 6e-23
Identities = 56/56 (100%)
Strand = Plus / Minus
Query: 1 aagccgaattctgcagatatccatcacactggcgccgctcgagcatgcatctaga 56
Sbjct: 71 aagccgaattctgcagatatccatcacactggcgccgctcgagcatgcatctaga 16

>[gi|6649866|gb|AF015282.1|AF015282](#) Mus musculus MHC class II beta (Rmcs5) gene, partial cds
Length = 728
Score = 111 bits (56), Expect = 6e-23
Identities = 56/56 (100%)
Strand = Plus / Minus
Query: 1 aagccgaattctgcagatatccatcacactggcgccgctcgagcatgcatctaga 56
Sbjct: 56 aagccgaattctgcagatatccatcacactggcgccgctcgagcatgcatctaga 1

>[gi|3411025|gb|AF018044.1|AF018044](#) Uncultured bacterium 1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 689
Score = 111 bits (56), Expect = 6e-23
Identities = 56/56 (100%)

l'expression du gène rapporteur en tabac. Nous pouvons dès lors envisager de passer à l'analyse des régénérants transformés avec des fragments raccourcis de celui-ci.

La figure 38 montrant de manière non exhaustive un aperçu des colorations observées, il semble apparaître que l'activité GUS est maximale jusqu'à une taille de "promoteur" de 440 bp (Fig. 38 a-d). En dessous de cette taille (Fig. 38 e-f), l'intensité de la coloration GUS observée est moindre, bien que toujours partiellement présente. Dans ce cas, les poils glandulaires n'apparaissent plus fortement bleutés à leur extrémité mais d'un bleu pâle dans leur ensemble (extrémité comprise). On peut toujours y observer, en faible quantité, la présence de cristaux de X-gluc ayant précipités suite à l'activité GUS. Ces cristaux sont responsables de cette coloration bleutée. La photo "g" de la figure 38 illustre la coloration des poils glandulaires d'un plant de tabac non transformé. Elle démontre bien que la coloration bleutée observée dans PR05 ne peut être due à une coloration endogène des poils glandulaires de la plante puisque ceux-ci ont une coloration vert pâle, voir transparente, suivant l'angle d'incidence de la lumière. Le contrôle positif PBI121, contenant le promoteur fort CaMV35S, est bizarrement peu coloré après la détection GUS.

b) Tests PCR

Ces tests ont pour but de démontrer la présence du matériel inséré au sein des plantes transformées. Pour ce faire, deux tests doivent être réalisés. Premièrement, il faut démontrer l'absence d'*Agrobacterium* au niveau des plants transformés (normalement éliminé lors du passage des explants sur milieu avec carbénicilline). Deuxièmement, il faut amplifier une séquence présente au sein du T-DNA. Un résultat positif lors de cette seconde amplification ne pourra être attribuée à des bactéries résiduelles.

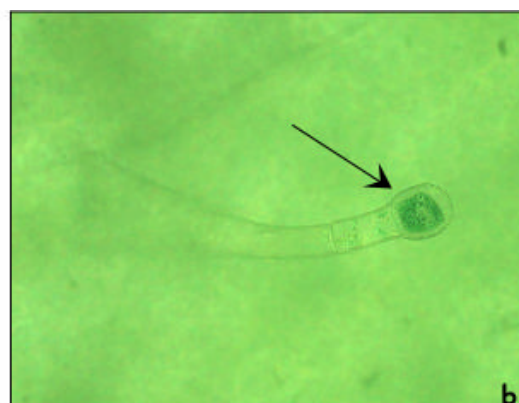
L'ADNg des 10 plants ayant servi pour le test GUS est obtenu par le Kit NucleoSpin Plant (Macherey-Nagel) tel que spécifié dans la section matériel et méthode. L'ADN récupéré de chaque demi-feuille (d'un poids inférieur à 50 mg) est élué dans 100 µl de tampon d'éluion fourni dans le kit. C'est cet éluat qui servira aux amplifications.

Une première PCR a été réalisée en utilisant une paire d'amorces amplifiant un fragment de 366 bp (figure 39) du gène de la glucosaminitol déhydrogénase d'*Agrobacterium tumefaciens*. Les amplifications ont été réalisées en 35 cycles avec une température d'hybridation de 60°C et un temps d'élongation de 1 minute. Les ADN génomiques de 10 plantes sont utilisés comme matrice. Un contrôle positif, *Agrobacterium* contenant la construction Pr01, est ajouté au test. La figure 40 démontre que les ADN génomiques purifiés de dix plantes transformées ne sont pas contaminés par de l'ADN d'*Agrobacterium*.

Un second test vise à démontrer l'intégration du matériel génétique (promoteur partiels + GUS) au sein du génome de la plante. Pour ce faire, le couple d'amorces GUSg/GUSd a été



Pr01 (1068 bp)



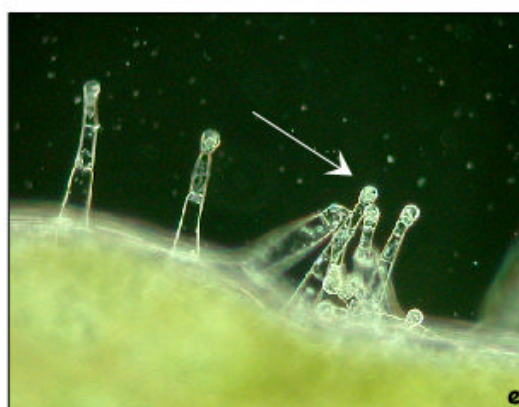
Pr02 (898 bp)



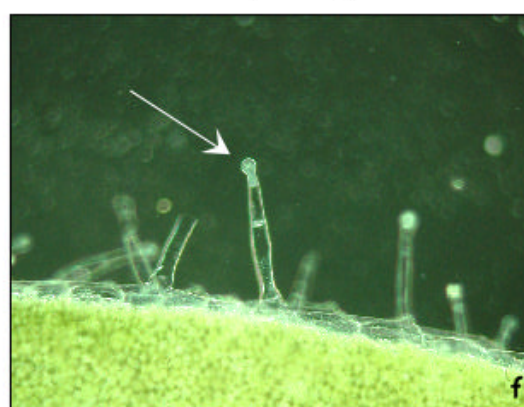
Pr03 (696 bp)



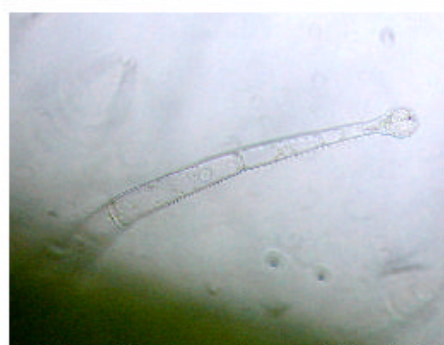
Pr04 (440 bp)



Pr05 (244 bp)



P121 (contrôle positif)



Tabac Non transformé (témoin)

Figure 38 : Coloration histochimique prouvant l'expression du gène GUS dans les différentes construction (a-e) et dans le contrôle positif(f). Pas de coloration dans le plant non-transformé (g)

utilisé. Cette paire d'amorces, déjà disponible au sein du laboratoire, a été définie pour amplifier un fragment de 1050 bp au sein du gène GUS (figure 41).

GUSg: GGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAA
GUSd: CGTCACCGAGGCTGTAGCCGA

Le test est réalisé sur l'ADN génomique des 10 plantes ainsi que sur des *Agrobacterium* contenant la construction PR01 (contrôle positif) et sur de l'ADN de *Nicotiana Tabacum* non transformé (contrôle négatif). Ces amplifications ont été réalisées en 35 cycles avec une température d'hybridation de 65°C et 1 minute d'élongation. Comme illustré à la figure 42, il apparaît que l'ensemble des plants analysés contient bien le gène GUS. Les amplifications présentent la taille attendue, taille d'ailleurs identique entre le contrôle positif et les plants testés. Le contrôle "ADN génomique de tabac non transformé" ne présente quand à lui aucune amplification.

3.3. Discussions

Au terme de ces manipulations, il apparaît que les quelques plants de tabac testés ont bel et bien été transformés tels que le démontrent les tests PCR réalisés. Le fragment de 1050 bp semble suffisant pour réguler l'expression du gène rapporteur dans le système étudié. Il apparaît également que le raccourcissement progressif de ce fragment semble diminuer l'activité GUS et ce à partir d'une taille inférieure à 440 bp. L'influence du fragment parasite de 56 bp présent dans les constructions Pr03 et Pr05 reste discutable à ce stade des analyses.

L'obtention de nouvelles constructions (sans les 56bp) sera incontournable afin de pouvoir tirer des conclusions définitives quant à une première délimitation des régions du promoteur intervenant potentiellement dans la régulation de l'activité SST.

La faible coloration localisée observée au niveau du contrôle positif pBI121 reste à ce jour sans explication. On aurait pu s'attendre à une expression un peu plus généralisée puisque le gène rapporteur est sous le contrôle d'un promoteur constitutif (CaMV35S). Pourtant, les plants testés contiennent effectivement la séquence d'intérêt tel que le démontre les tests PCR.

Il ne sera évidemment possible de tirer des conclusions quant au fonctionnement du promoteur SST que sur base d'analyses d'un nombre plus élevé de transformants de chicorée. Ces analyses devront par ailleurs être confirmées par des techniques complémentaires d'analyses de promoteur.

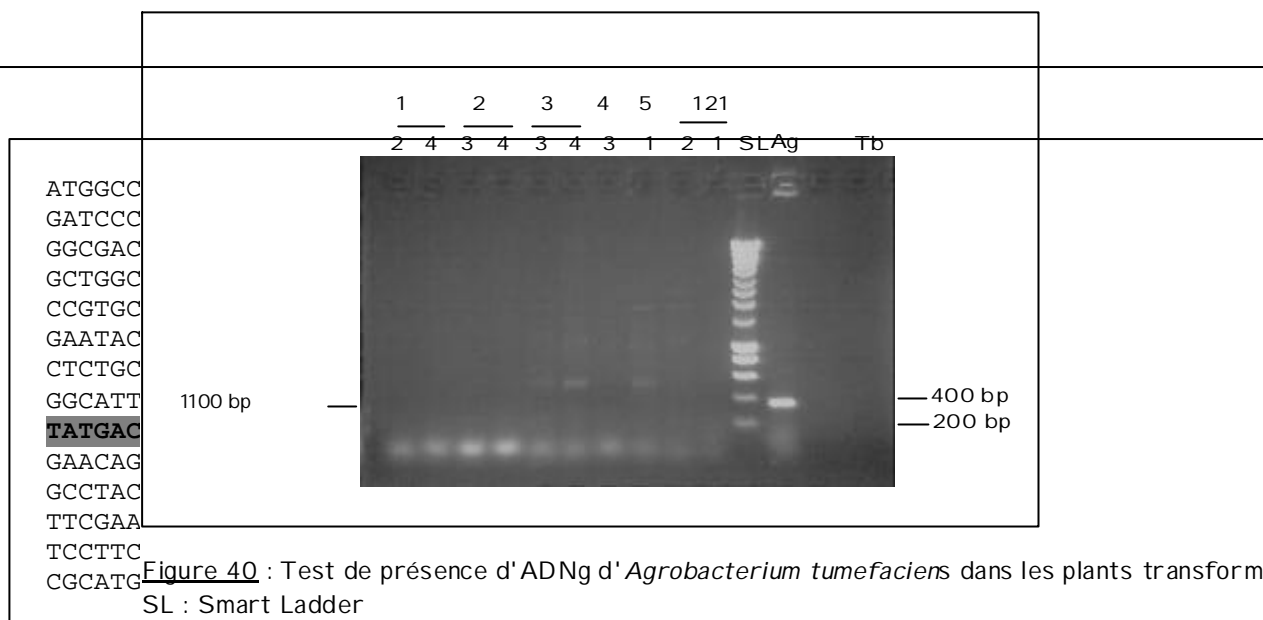


Figure 40 : Test de présence d'ADNg d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les plants transformés

SL : Smart Ladder

Figure 1-2 et 1-4 : construction contenant PR01

(TTTC) 2-3 et 2-4 : construction contenant PR02

Taille 2 et 1-4 : construction contenant PR03

1-2 et 1-4 : construction contenant PR04

1-2 et 1-4 : construction contenant PR05

1-2 et 1-4 : construction contenant pBI 121

Ag : *Agrobacterium* transformé avec la construction PR01

Tb : ADNg de tabac non transformé

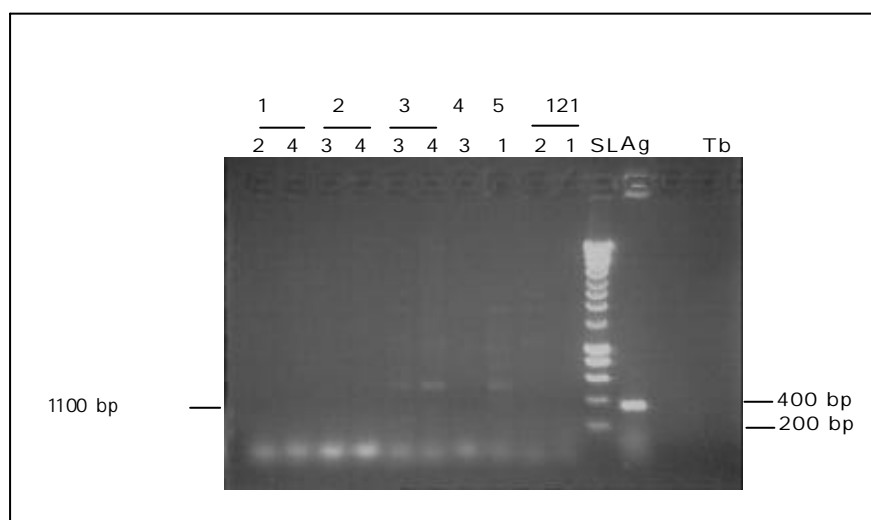


Figure 40 : Test de présence d'ADNg d'*Agrobacterium tumefaciens* dans les plants transformés

SL : Smart Ladder

1-2 et 1-4 : construction contenant PR01

2-3 et 2-4 : construction contenant PR02

2 et 1-4 : construction contenant PR03

1-2 et 1-4 : construction contenant PR04

1-2 et 1-4 : construction contenant PR05

1-2 et 1-4 : construction contenant pBI 121

Ag : *Agrobacterium* transformé avec la construction PR01

Tb : ADNg de tabac non transformé

GTGGACGATATCACCGTGGTGACGCATGTGCGCGAAGACTGTAACCACGCGTCTGTTGACTGGCAGGTGGTGGCCAATGGTGA
 TGTCAGCGTTGAACTGCGTGATGCGGATCAACAGGTGGTTGCAACTGGACAAGGCACTAGCGGGACTTTGCAAGTGGTGAATC
 CGCACCTCTGGCAACCGGGTGAAGGTTATCTCTATGAACTGTGCGTCAACAGCCAAAAGCCAGACAGAGTGTGATATCTACCCG
 CTTCGCGTCTGGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAAGGGCGAACAGTTCCTGATTAACCACAAACCGTTCTACTTTACTGGCTTTGG
 TCGTCATGAAGATGCGGACTTGCCTGGCAAAGGATTCGATAACGTGCTGATGGTGCACGACCACGCATTAATGGACTGGATTG
 GGGCCAACCTCCTACCGTACCTCGCATTACCTTTACGCTGAAGAGATGCTCGACTGGGCAGATGAACATGGCATCGTGGTGATT
 GATGAAACTGCTGCTGTGCGGCTTTAACCTCTCTTTAGGCATTGGTTTCGAAGCGGGCAACAAGCCGAAAGAACTGTACAGCGA
 AGAGGCAGTCAACGGGGAACTCAGCAAGCGCACTTACAGGCGATTAAAGAGCTGATAGCGCGTGACAAAAACCCCAAGCG
 TGGTGATGTGGAGTATTGCCAACGAACCGGATACCGTCCGCAAGGTGCACGGGAATATTTTCGCGCCACTGGCGGAAGCAACG
 CGTAAACTCGACCCGACGCGTCCGATCACCTGCGTCAATGTAATGTTCTGCGACGCTCACACCGATACCATCAGCGATCTCTT
 TGATGTGCTGTGCCTGAACCGTTATTACGGATGGTATGTCCAAAGCGGCGATTTCGAAACGGCAGAGAAGGTACTGGAAAAAG
 AACTTCTGGCCTGGCAGGAGAACTGCATCAGCCGATTATCATCACCGAATACGGCGTGGATACGTTAGCCGGGCTGCACTCA
 ATGTACACCCGACATGTGGAGTGAAGAGTATCAGTGTGTCATGGCTGGATATGTATCACCAGCTCTTTGATCGCGTCAGCGCGGT
 CGTCGGTGAACAGGTATGGAATTTTCGCCGATTTTTCGACCTCGCAAGGCATATTCGCGCTTGGCGGTAACAAGAAAGGGATCT
 TCACTCGCGACCGCAAACCGAAGTCGGCGGCTTTTCTGCTGCAAAAACGCTGGACTGGCATGAACTTCGGTGAAAAACCGCAG
 CAGGGAGGCAACAATGAATCAACAACCTCCTGGCGCACCATCGTCGGCTACAGCCTCGGGAATTGCTACCGAGCTCGAATT
 TCCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATCCTGTTGCGGCTCTTTCGATGATTATCATATAATTT
 CTGTTGAATTACGTTAAGCATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGATTAGAGTCCC
 GCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAATATAGCGCGCAAACTAGGATAAATTATCGCGCGCGGTGTCATCTATGT
 TA

Figure 40 Localisation des amorces GUSg-GUSd dans pBI 121.

Gusd : hybridation partielle sur pBI 121 sur le site **tcggctacagcctcggaatt** de l'amorce
 cgtcaccgaggtgtagccga

Gusg : **ggcatccggtcagtgagtgaa**

Taille attendue pour l'amplicon : 1050 bp

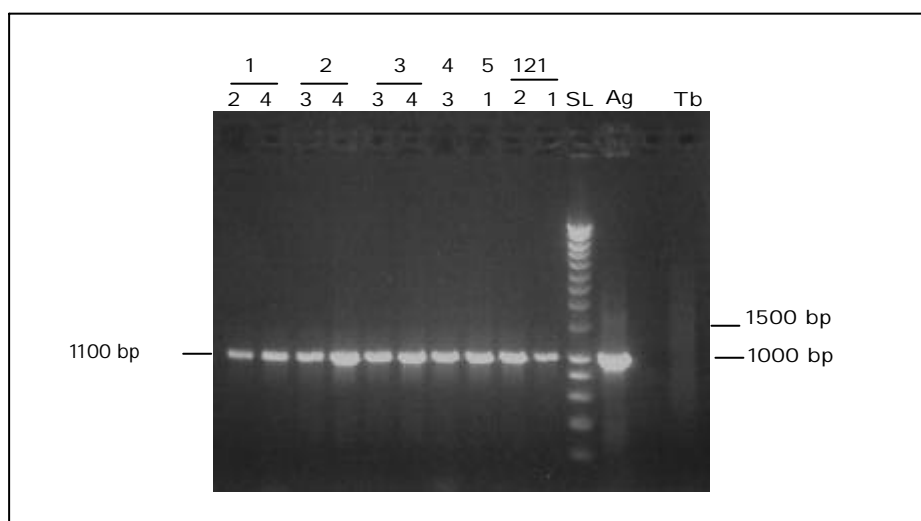


Figure 42 : Test d'intégration du T-DNA dans les plants transformés par amplification Gusg-Gusd

SL : Smart Ladder

1-2 et 1-4 : construction contenant PR01

2-3 et 2-4 : construction contenant PR02

2 et 1-4 : construction contenant PR03

1-2 et 1-4 : construction contenant PR04

1-2 et 1-4 : construction contenant PR05

1-2 et 1-4 : construction contenant pBI 121

Ag : *Agrobacterium* transformé avec la construction PR01

Tb : ADNg de tabac non transformé

Chapitre 5 : Conclusions et Perspectives

Au terme de ce mémoire, de nombreux résultats ont été obtenus et laissent envisager une multitude de perspectives.

L'étude réalisée sur l'évolution du niveau des transcrits des SST et FFT a permis d'établir que le niveau de transcrits FFT est relativement constant en cours de saison alors que celui des transcrits SST apparaît comme étant sensiblement influencé par la diminution des températures, conformément aux résultats publiés chez d'autres espèces accumulatrices de fructanes [12].

Ces résultats nous ont permis de restreindre l'isolement du promoteur à la seule séquence SST. Les manipulations réalisées ont permis l'isolement de deux fragments principaux, l'un de 1300 bp et l'autre de 3000 bp. Pour des raisons pratiques, le fragment de 1300 bp (1080 bp au sein du promoteur et 220 dans la séquence codante) a été isolé et a servi de matrice afin d'obtenir, par amplification, des fragments raccourcis. Ces 4 fragments de respectivement 898, 696, 440 et 244 bp ainsi que le fragment total de 1080 bp ont pu être clonés dans le vecteur de transformation pBI121.

Une fois la vérification de l'insertion du vecteur d'intérêt dans la souche *d'Agrobacterium* effectuée, 6 transformations ont été réalisées. Cinq contenant tout ou une partie du fragment de promoteur isolé et une sixième qui constitue un contrôle positif (vecteur pBI121 avec promoteur constitutif CaMV)

Ces six constructions ont alors été utilisées pour transformer deux espèces végétales à savoir la chicorée, espèce de laquelle provient la séquence étudiée, et le tabac, régulièrement utilisé comme contrôle de transformation.

Le temps nécessaire à la régénération des plants étant relativement long, seul le tabac, présentant une régénération plus rapide, a pu être utilisé pour la réalisation des tests histochimiques et les analyses PCR.

Il ressort des tests PCR que l'ensemble des plants testés présentent bien dans leur génome l'intégration du gène GUS, séquence comprise entre les bords gauche et droit du T-DNA. Ceci nous amenant à penser que le reste de la construction s'y trouve également.

Les observations préliminaires quant à l'effet des délétions sur l'expression du gène rapporteur, exposées dans le chapitre précédent, semblent suggérer qu'une zone potentielle d'environ 440 bp pourrait contenir des régions intervenant dans la régulation de l'expression du gène SST. Des réserves doivent cependant être émises quant à ces résultats puisque l'insertion d'une séquence parasite dans deux constructions pourrait affecter la réponse normalement observée si celles-ci n'étaient pas présentes. De nouvelles constructions devront donc impérativement être obtenues et testées.

Il semble que, globalement, les résultats obtenus sont encourageants. Ils nécessitent cependant des analyses complémentaires que le temps limité dont nous disposons ne nous a pas permis de réaliser.

Premièrement, il faudra réaliser l'analyse d'un plus grand nombre de plants pour chacune des transformations, en particulier pour le fragment le plus court (Pr05) et pour le contrôle positif pBI121. Il faudra ensuite faire de nouveaux tests PCR avec des amorces permettant l'amplification totale de l'insert. Pour ce faire, il faudra par exemples utiliser des amorces définies sur les régions "bord gauche" et "bord droit" du T-DNA. De cette manière, nous pourrons vérifier l'intégrité du fragment inséré.

Nous avons jusqu'à présent travaillé sur le tabac, faute de chicorée suffisamment développées. Dans un avenir proche, il sera intéressant de réaliser les mêmes tests sur les plantules de chicorées transformées. A ce moment, la localisation de l'expression de la SST fournira également des informations précieuses quant à l'expression spatiale et temporelle de la SST. Des tests réalisés dans diverses conditions environnementales (température, disponibilité en eau, salinité) permettront de réaliser une étude de la manière dont l'activité sera affectée par les délétions et de localiser la réponse apportée face à ces modifications. Des tests d'activité réalisés sur base de protéines isolées fonctionnelles pourront venir ajouter un aspect quantitatif aux résultats qualitatifs déjà obtenus sur base de la coloration GUS.

Une fois l'étude préliminaire du promoteur réalisée par raccourcissements successifs, une étude plus fine des régions définies comme étant potentiellement intéressantes pourra être entamée. Les techniques du gel retard, du footprinting, et de la mutagenèse dirigée permettront d'affiner l'étude en cours. Enfin, à beaucoup plus long terme, l'étude des protéines interagissant avec les éléments *cis* isolés est envisageable.

Annexes

Annexe 1: *Agrobacterium* (d'après [16, 72-75])

1.1. Introduction

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie Gram négative appartenant à la famille des *Rhizobium* impliqués dans la nodulation des racines de plantes fixatrices d'azote. Ce micro-organisme du sol est un parasite des plantes responsables de la maladie de la galle du collet. Cette maladie est causée par un plasmide particulier porté par la bactérie, le plasmide Ti (Tumor Inducing).

Le plasmide Ti contient différents gènes dont plusieurs sont regroupés en une région appelée T-DNA (Transfert-DNA). C'est une copie de ce T-DNA qui est intégrée au génome végétal et qui induit la maladie de la galle du collet se traduisant par une division anarchique des cellules en perturbant la production d'hormones (auxine et cytokine). Une autre région importante du plasmide est la zone *vir* qui code pour des protéines et des enzymes responsables de l'insertion du T-DNA dans le génome végétal. La production de ces protéines n'a lieu que si la bactérie détecte la présence de molécules signal comme l'acétosyringone libérée par la plante en cas de blessure.

Il existe différentes souches d'*Agrobacterium* portant des plasmides Ti divers qui sont classés d'après le type d'opine codé. Par exemple, le plasmide pTiA6 code pour la production et l'utilisation d'octopine et pTiC58 code pour la production et l'utilisation de nopaline. Ces molécules sont utilisées par la bactérie comme source d'azote et de carbone et comme inducteur pour le transfert du plasmide Ti entre les bactéries.

1.2. Conditions d'adhésion

Pour que la transformation puisse avoir lieu, il existe des conditions d'adhésion faisant intervenir des facteurs propres à la plante et à la bactérie.

Ce sont les plus anciennes expériences qui ont démontré qu'une blessure de la plante était indispensable pour que la tumeur puisse se développer. De plus, la tumorigénèse n'apparaît que si la bactérie est en contact avec une blessure nouvelle, ne datant que de quelques jours. L'expression d'une série de gènes nécessaires pour développer la maladie est induite par des composés produits dans les tissus blessés dont l'acétosyringone (AS). Des molécules, autres que l'AS qui est la molécule la plus couramment citée, peuvent induire la transcription de la zone *vir* : acide sinapinique, acide p-hydroxybenzoïque et vanilline.

La toute première étape de la transformation est bien entendu l'interaction entre *Agrobacterium* et la plante. La bactérie s'attache à la surface de la cellule végétale. Au début, suite à la formation de fibres de cellulose par les micro-organismes, c'est un agrégat de bactéries qui vient se fixer à la surface de la cellule végétale. L'ancrage des bactéries en surface des cellules végétales en est renforcé. L'adhésion d'*Agrobacterium tumefaciens* implique l'interaction de molécules de surface avec la paroi végétale. Une de ces

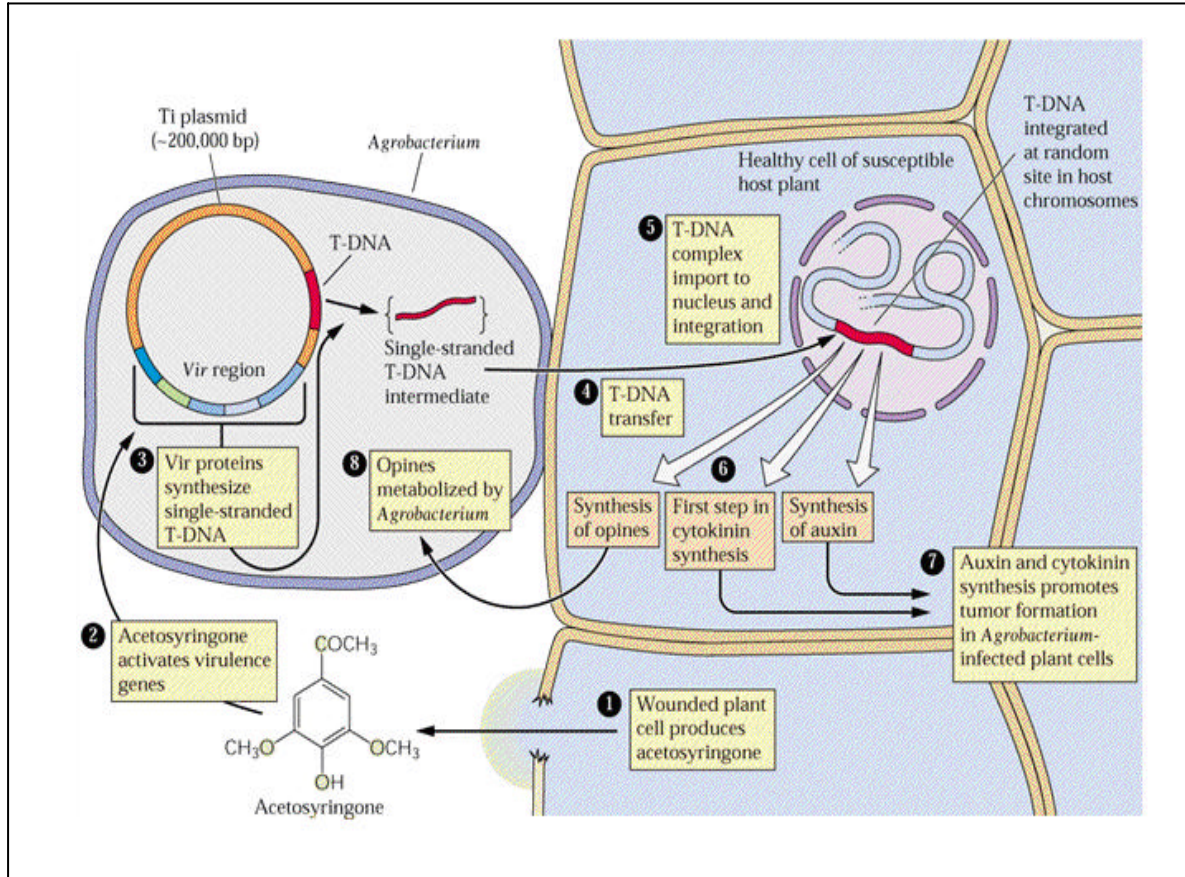


Figure 43 : Schéma du transfert de T-DNA par *Agrobacterium*. 1: Production d'acetosyringone par une cellule végétale suite à une blessure. 2: L'acétosyringone active les gènes de la région Vir. 3: Les protéines Vir synthétisent un T-DNA simple brin. 4: Transfert du T-DNA. 5: Importation du T-DNA dans le noyau et intégration au génome. 6: (de gauche à droite) Synthèse d'opines/Première étape de la synthèse de cytokines/Synthèse d'auxine. 7: La synthèse d'auxine et cytokinine induit la formation de tumeurs. 8: Les opines sont métabolisées par *Agrobacterium*

molécules est le lipopolysaccharide (LPS) mais d'autres loci semblent avoir leur importance dans ce processus : il s'agit de *chvA*, *chvB*, *chvE*, *cel*, *att* et *pscA* (*exoC*).

chvA (1.5 kb) et *chvB* (5.0 kb) sont des unités transcriptionnelles physiquement proches sur le chromosome. Ces loci sont exprimés de façon constitutive. Les cellules mutées au niveau de ces gènes n'ont pas une efficacité de transformation élevée : l'interaction physique avec la cellule végétale est faible. Ces mutants sont défectueux dans la production de α -1,2-D-glucane. Ce polysaccharide aurait un rôle dans l'adhésion. Le locus *pscA* (3.0 kb) est aussi une unité transcriptionnelle constitutivement exprimée et les bactéries mutées dans ce gène sont avirulentes, ou plutôt très atténuées dans leur virulence. Ce gène est impliqué dans la production d'un polysaccharide de surface. Les mutants *pscA* sont défectueux entre autre dans la production de fibres de cellulose. Quant aux loci *chvE*, il est indispensable dans l'activation par le sucre de la région *vir* et pour le chimotactisme bactérien. Le locus *cel* est responsable de la synthèse de fibres de cellulose et le locus *att* (20 kb) intervient dans les protéines de surface.

Au sein de la plante, des molécules sont capables de modifier la force d'adhésion. Il y a des vitronectine-like, semblables à la vitronectine animale, et des pectines qui entrent en jeu. C'est pour cette raison que des protoplastes dépourvus de paroi cellulaire ne peuvent être transformés par *Agrobacterium*.

1.3. Le plasmide Ti

Le plasmide Ti est constitué de deux régions jouant chacune un rôle important dans l'infection :

- la région *vir* (30 kb) est la région de virulence. Elle n'est pas directement responsable de la maladie mais contrôle l'excision du T-DNA. Elle contient 7 opérons dont 4 (*virA*, *virG*, *virB* et *virD*) codant pour des protéines essentielles au processus de transfert et 3 autres (*virC*, *virE* et *virF*) qui ne sont nécessaires que pour l'infection de certaines espèces.

- le T-DNA est responsable de la galle du collet. Il est bordé de deux régions de 25 pb en répétition directe, RB et LB (Right/Left border). Contrairement aux éléments classiques de transposition, il ne code pas pour les protéines impliquées dans son déplacement. Ces bords sont les seuls éléments *cis* indispensables au transfert ! Dans le T-DNA se trouvent les zones responsables de la synthèse d'auxine, de cytokine et d'opines (nopaline ou octopine).

En génie génétique végétal, l'ADN présent entre les deux bords du T-DNA a été remplacé par de l'ADN d'intérêt. On dit alors que le plasmide Ti est désarmé puisqu'il ne contient plus les éléments nécessaires au développement de la galle du collet.

1.4. Transformation (fig. 43)

a) Copie du T-DNA

Pour qu'*Agrobacterium* infecte une plante, il faut que celle-ci soit blessée. Dans ce cas, des molécules d'AS sont libérées par la plante et sont détectées par la bactérie. Lorsque la protéine constitutive VirA, récepteur transmembranaire à deux composants, perçoit la molécule signal émise par la plante, elle active la protéine VirG par phosphorylation. VirG, facteur de transcription, peut alors induire la transcription des gènes de la région *vir*. Notons que si VirA et VirG sont des protéines constitutives, leur

niveau d'expression augmente en réponse aux inducteurs phénoliques (voir les conditions d'adhésion). Les conditions favorables pour la transcription de la région *vir* ne s'arrêtent pas là : le pH doit être acide et la concentration en monosaccharide élevée. La zone *vir* code pour des protéines qui interviendront dans la duplication du T-DNA en ADNss, dans sa protection lors du transport à travers la membrane bactérienne et, enfin, dans l'intégration de la copie du T-DNA dans le chromosome de l'hôte végétal. Ce sont les protéines VirD1 (16 kDa) et VirD2 (47 kDa) qui reconnaissent les bords de 25 bp et qui coupent un brin à l'extrémité de chacun d'eux. Ces coupures sont alors utilisées comme sites d'initiation et de terminaison pour la production de l'ADNss.

Le locus *virC* code pour 2 polypeptides VirC1 (23 kDa) et VirC2 (26 kDa) qui favorisent la coupure de l'ADN au niveau des RB et LB.

Bien que la méthode de transformation des dicotylées par *Agrobacterium* soit aisée et efficace, elle demeure plus ardue pour les monocotylées. En effet, la libération d'AS est essentielle pour la transformation. Cette molécule est présente à un niveau très faible dans les tissus indemnes mais est significativement plus abondante dans les tissus blessés. Les hôtes potentiels d'*Agrobacterium* sont limités car certaines plantes répondent différemment en cas de blessure. C'est le cas de la plupart des céréales. Au lieu de libérer les molécules qui seront reconnues, les cellules proches de la blessure libèrent un composé phénolique qui entraîne leur mort. Dès lors d'autres systèmes de transformation ont été élaborés afin de pouvoir intégrer de l'ADN au génome de ces plantes : bombardement de particules, vecteurs viraux, transformation de protoplastes par utilisation de polyéthylène glycol ou électroporation, micro-injection d'ADN dans des protoplastes du mésophylle et macro-injection d'ADN dans les jeunes tiges des céréales.

b) Formation du complexe-T

La protéine VirD2 reste bien attachée en 5' qui sera l'extrémité de tête. Le brin-T doit traverser une série de membranes et d'espaces cellulaires avant d'arriver dans le noyau de la cellule végétale. Pour conserver son intégrité, il est transféré sous la forme d'un complexe ADNss-protéines. Ce sont les protéines VirE2 (60,5 kDa), protéines de liaison à l'ADNss, encodées par le locus *virE*, qui viennent se fixer de façon non-spécifique. Une molécule VirE2 recouvrirait environ 30 nucléotides; le brin d'ADN complètement recouvert est ainsi protégé des exo- et des endonucléases. De plus, en se liant à l'ADN, VirE2 le déplie et l'allonge : son diamètre étroit (2 nm) lui permet de franchir plus facilement les canaux membranaires d'un diamètre de 9 à 10 nm. Accompagné de VirD2 et VirE2, le T-DNA porte le nom de complexe-T. Ce complexe doit encore sortir de la cellule bactérienne, franchir les membranes interne et externe, mais aussi traverser les paroi et membranes végétales.

c) Traversée des membranes bactériennes

Le complexe-T est constitué au minimum du T-DNAss et des protéines VirE2 et VirD2. Ces deux types de protéines seraient suffisantes pour protéger et diriger le brin d'ADN. Mais les mouvements du complexe-T nécessitent d'autres activités.

La première étape est la traversée de la membrane bactérienne. Des protéines Vir altéreraient la membrane en y créant un pore ou un canal transmembranaire. Les produits du gène *virB* seraient

impliqués dans ce processus. Il possède 11 ORF possibles, aboutissant aux protéines suivantes : VirB1 (26 kDa), VirB2 (12 kDa), VirB3 (12 kDa), VirB4 (87 kDa), VirB5 (23 kDa), VirB6 (32 kDa), VirB7 (6 kDa), VirB8 (26 kDa), VirB9 (32 kDa), VirB10 (41 kDa) et VirB11 (38 kDa). Ces protéines ont différentes spécificités dans la formation du canal membranaire. Certaines sont localisées dans la membrane interne ou dans la membrane externe, d'autres sont des ATPases qui apportent de l'énergie pour le déplacement du complexe-T, ou constituent uniquement le canal. Les fonctions des gènes vir sont complétées par des hélicases et des polymérases.

d) Entrée dans la cellule végétale

Dans la cellule végétale, le complexe-T se dirige vers le noyau. Des protéines cytosoliques reconnaissent une séquence d'adressage nucléaire portée par VirD2. Elles amènent le complexe-T vers le noyau et il pénètre la membrane nucléaire. Le complexe de 2 nm de diamètre traverse aisément le pore nucléaire, canal d'un diamètre de 9-10 nm. Le T-DNA atteint les chromosomes où il peut s'intégrer.

e) Intégration du T-DNA dans l'ADN de la plante

L'étape finale de la transformation génétique de cellules végétales est l'intégration de la copie du T-DNA dans l'ADN de la cellule végétale. En général l'insertion peut avoir lieu dans n'importe quel chromosome, de préférence dans des régions transcriptionnellement actives. Ces régions sont plus accessibles pour l'ADN exogène. En simplifiant, on peut dire que l'extrémité 5' du brin-T envahit l'ADN de la plante au niveau d'une cassure. De courtes homologies, de une à quelques paires de bases, permettent un appariement entre les deux types d'ADN au niveau des extrémités.

1.5. Génie génétique végétal

En génie génétique végétal, la transformation via d'*Agrobacterium* se fait généralement en présence de plasmides binaires. Ces plasmides binaires sont plus facilement manipulables que le plasmide Ti dont la taille varie entre 100 et 200 kb. Deux plasmides sont alors utilisés : le plasmide de transformation et le plasmide 'helper'. La région *vir* y exerce sa fonction en *trans*. Le plasmide 'helper' reprend presque l'ensemble du plasmide Ti sans la région du T-DNA. Ce plasmide 'helper' est présent en permanence dans la bactérie. Le second plasmide est plus petit et porte le gène d'intérêt encadré par les régions RB et LB (reconnues par la machinerie Vir), ainsi qu'un marqueur de sélection placé sous le contrôle d'un promoteur végétal. Le marqueur de sélection le plus utilisé est une résistance à la kanamycine. Ce gène d'origine bactérienne est flanqué d'éléments de régulation propres aux végétaux. D'autres marqueurs peuvent être utilisés. Il s'agit de résistances à l'hygromycine ou à des herbicides tel le Basta® (Hoechst). En plus, le vecteur binaire contient un site multiple de clonage qui permet l'insertion de gènes étrangers. Dès lors, le gène d'intérêt peut être inséré dans le T-DNA. Il est intégré à un plasmide dont la réplication est possible tant en *E. coli* que dans *Agrobacterium*. Ce plasmide pourra ainsi être multiplié dans *E. coli* avant de réaliser la transformation d'*Agrobacterium*. Le gène d'intérêt et le marqueur de sélection présents dans le T-DNA sont cotransférés d'*Agrobacterium* vers la plante grâce au plasmide 'helper'.

Ce transfert commence au niveau du bord droit pour généralement se terminer au bord gauche du T-DNA. Parfois, le transfert est interrompu, par exemple si le gène d'intérêt contient une séquence similaire à celle du LB. Pour s'assurer que le transformant a intégré la totalité du gène d'intérêt, un marqueur de sélection peut être placé à proximité du LB.

Le gène d'intérêt est placé sous le contrôle d'un promoteur qui sera reconnu par les facteurs de transcription présents dans la plante modèle utilisée. Généralement, c'est le promoteur du gène codant pour la mosaïque du chou-fleur qui est utilisé, ou 35S-CaMV, qui est connu pour être un promoteur fort. Des promoteurs inductibles peuvent aussi être utilisés, l'expression du gène pourra alors être spécifique à certains organes ou à certaines conditions. Des promoteurs synthétiques induits par une substance chimique permettent d'éviter une activation du promoteur inductible par des métabolites inducteurs présents dans les cellules mais à un moment non désiré.

1.6. Caractéristiques des vecteurs binaires

De nombreux chercheurs ont développés des vecteurs binaires qui peuvent être regroupés selon leur utilisation. Le vecteur binaire de base contient un réplicon convenant pour beaucoup d'hôtes avec les bords du T-DNA, un marqueur de sélection et les sites de clonages. Ces plasmides ne sont pas transmis spontanément mais peuvent être répliqués dans une large gamme d'hôtes Gram négatifs dont *E. coli* et *Agrobacterium*.

La souche *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 contient le plasmide 'helper' pAL4404 qui encode les gènes de virulence indispensables au transfert du T-DNA.

Dans le cas du vecteur pBI121 (utilisé lors de ce mémoire), le gène de résistance à la kanamycine (*npt*, néomycine phosphotransférase) est muté : celui-ci étant moins efficace, bien que toujours fonctionnel, il en découle que les plantes transformées avec ce vecteur sont plus sensibles à l'antibiotique que les plantes transformées avec un plasmide contenant le gène sauvage.

Des vecteurs binaires de base ont été modifiés dans des buts expérimentaux. Ils portent un marqueur supplémentaire tel la β -glucuronidase (GUS), la chloramphénicol acétyltransférase (*cat*) ou encore le gène de la luciférase placés sous le contrôle d'un promoteur fort : ces constructions permettent de suivre la stabilité de la transformation. Cependant, il faut veiller à ce que ces enzymes ne soient pas naturellement présentes dans la plante. Le gène de la luciférase a été isolé d'une luciole; il code pour une enzyme qui catalyse la production de lumière par oxydation ATP-dépendante de luciférine. Mais le niveau de lumière produit par la luciférine est très faible et nécessite un luminomètre coûteux pour l'analyse. L'avantage de ce gène est que les tests ne sont pas destructifs. Pour ce qui est du gène GUS, l'activité endogène qui pourrait être présente dans la plante, bien que cela soit rare, se distingue généralement de l'activité GUS introduite. Et enfin, le gène *cat* est un rapporteur sensible utilisé dans plusieurs organismes et il y a peu d'interférences concernant son activité dans les tissus végétaux. De plus, l'utilisation de rapporteurs portant un intron peut minimiser les faux positifs qui proviendraient d'une expression bactérienne.

1.7. Le gène rapporteur GUS

Le rapporteur le plus souvent utilisé est le gène GUS. Le gène GUS de *E. coli* code pour une hydrolase acide qui catalyse la clivage d'un grand nombre de β -glucuronides. En général, le substrat de la β -glucuronidase est soluble dans l'eau et pourra entrer dans les cellules végétales. Parmi ces substrats, il en existe pour la spectrophotométrie, pour la fluorométrie, et pour les analyses histologiques. Ces analyses histologiques sont intéressantes pour localiser l'expression de la β -glucuronidase et ainsi le fonctionnement du promoteur. Le substrat histochimique permettant des résultats visuels est le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (X-glc). Ce substrat peu coloré est hydrolysé par la β -glucuronidase et libère un dérivé indolyl qui forme un colorant indigo qui précipite. L'analyse de l'expression du gène rapporteur GUS se fait habituellement après fixation des tissus, mais peut également être réalisée sur tissus frais en mettant le substrat directement dans le milieu de culture.

1.8. Les vecteurs binaires dans l'analyse de promoteurs

Les vecteurs binaires peuvent être utilisés lors de l'étude d'éléments de régulation impliqués dans l'initiation de la transcription. Il existe des vecteurs contenant le rapporteur *cat* immédiatement en aval du site multiple de clonage, sans promoteur (pGA581, pGA582 et pGA809). L'insertion d'un fragment de promoteur en amont du gène rapporteur aboutit à la production d'ARNm *cat*. Si le fragment porte seulement la région du promoteur, sans région codante, alors l'ARNm *cat* produira une enzyme CAT. Par contre, si le fragment contient une partie de la région codante, il est important d'insérer ce fragment en phase avec la séquence codant pour Cat et l'on obtient une protéine de fusion. Le système CAT est très sensible et il est rare que cette enzyme soit endogène de la plante étudiée. L'inconvénient réside cependant en une inhibition possible de l'enzyme dans certaines plantes ! Néanmoins, il existe le même type de vecteurs construits avec le rapporteur GUS et également utilisés dans le cadre de l'étude de promoteurs.

1.9. Des systèmes ternaires

La souche *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 dans laquelle le gène constitutif *virG* muté (*virGN54D* - l'asparagine en position 54 est remplacée par un acide aspartique) a été insérée est capable de transférer le T-DNA de manière très efficace dans une gamme variée d'espèces végétales. Ces mutants *virG* peuvent induire la transcription des gènes *vir* sans avoir besoin du signal AS. L'activité VirG est dès lors indépendante de l'AS et donc de VirA, senseur du système à deux composants. Cette souche a été utilisée lors de ce mémoire.

Des études ont aussi été réalisées sur des souches contenant VirG supersensibles (177V - modification à la valine de la position 177), c'est-à-dire où la protéine n'induit pas la transcription s'il n'y a pas d'AS mais où son niveau d'activité atteint le maximum avec une concentration très faible de composé inducteur.

Annexe 2:

| nom | cible pour... | séquence | long. | Tm (2AT+4GC) | %gc |
|--------------|--|-------------------------------|-------|------------------|-------|
| GwCiSstPrEx1 | Genome Walker - C. intybus - Gène SST - Promoteur - am. Externe | GTGCGCACTCAACATCAGCATTGG | 24 | 72,0°C | 50 |
| GwCiSstPrIn1 | Genome Walker - C. intybus - Gène SST - Promoteur - am. Interne(nested) | TGGATAACAGCAACCAGAACACAG | 24 | 70,0°C | 45,83 |
| GwCiFftPrEx1 | Genome Walker - C. intybus - Gène FFT - Promoteur - am. Externe | ATAGTGTTGAGCCGAAGATTTCTCC | 25 | 72,0°C | 44 |
| GwCiFftPrIn1 | Genome Walker - C.intybus - Gène FFT - Promoteur - am. Interne (nested) | AAAGCTAAAACGAAGAACAGAGACAC | 26 | 72,0°C | 38,46 |
| RtCiSstg_1 | Reverse transcription - C. intybus - Gène SST - am. gauche | CCCAATTTTGTTCACCG | 19 | 58,0°C | 52,63 |
| RtCiSstd_1 | Reverse transcription - C. intybus - Gène SST - am. droite | CTTCATGTCCAACCATTCG | 19 | 56,0°C | 47,37 |
| RtCiFftg_1 | Reverse transcription - C. intybus - Gène FFT - am.gauche | GATTTCTCTCAACTACAATGC | 21 | 58,0°C | 38,1 |
| RtCiFftd_1 | Reverse transcription - C. intybus - Gène FFT - am.droite | GGTAAACAAGTACGAGTCCA | 20 | 58,0°C | 45 |
| RtCiFftd2 | Reverse transcription - C. intybus - Gène FFT - am.droite | AAGTGACCCTCCGTTTCTTC | 20 | 60,0°C | 46,65 |
| RtCiFftg2 | Reverse transcription - C. intybus - Gène FFT - am.gauche | GTCCCGATATGAAGCATGTG | 20 | 60,0°C | 49,71 |
| FpCiPrSST1g | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 1ère paire - am. Gauche | CGGCTTACTATAGGGCAGC | 19 | 60,0°C | 57,89 |
| FpCiPrSST1d | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 1ère paire - am. Droite | GGTTCATCTCCGACCCAC | 18 | 58,0°C | 61,11 |
| FpCiPrSST2g | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 2ème paire - am. Gauche | ACATCCAAATTCTAGTTTGACC | 22 | 60,0°C | 36,36 |
| FpCiPrSST2d | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 2ème paire - am. Droite | GGACATCTATGAGATTCCAAG | 22 | 62,0°C | 40,91 |
| FpCiPrSST3g | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 3ème paire - am. Gauche | TTGTAGCTGTGGGACAATCC | 20 | 60,0°C | 50 |
| FpCiPrSST3d | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 3ème paire - am. Droite | CTTTGGATGTGTATGTATTGGG | 22 | 62,0°C | 40,91 |
| FpCiPrSST4g | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 4ème paire - am. Gauche | ACGTTGATTAAATATTGCTTGTG | 23 | 60,0°C | 30,43 |
| FpCiPrSST4d | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 4ème paire - am. Droite | ATTAAGTACTAAACCATGAACC | 23 | 60,0°C | 30,43 |
| FpCiPrSST5d | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 5ème paire - am. Droite | GGGCAGATTTGAGTCTCATC | 20 | 60,0°C | 50 |
| FpCiPrSST5g | Footprinting - C. intybus - Promoteur du gène de la SST - 5ème paire - am. Gauche | GGTAGAAAGCAATAGGCAGG | 20 | 60,0°C | 50 |
| RtCiSSTg2 | Reverse transcription - C. intybus - Gène SST - am. Gauche 2 (amplicon plus grand) | ATTATGGATGGGTCCCTGATG | 20 | 58,0°C | 45 |
| PrCiSSTHind | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am. Gauche, avec site de restriction pour HindIII | AAGCTTCGGCTTACTATAGGGCAGC | 25 | 76,0°C ou 60,0°C | 52 |
| PrCiSSTXba | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am.droite, avec site de restriction pour XbaI | TCTAGATTTACTGTCTAAAGGTGAGTGT | 28 | 76,0°C ou 60,0°C | 35,71 |
| PrCiSst2Hind | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am. Gauche, délétion avec site de restriction pour HindIII | AAGCTTACATCCAAATTCTAGTTTGACC | 28 | 76,0°C ou 60,0°C | 35,71 |
| PrCiSst3Hind | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am. Gauche, délétion avec site de restriction pour HindIII | AAGCTTTTG TAGCTGTGGGACAATCC | 26 | 76,0°C ou 60,0°C | 46,15 |
| PrCiSst4Hind | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am. Gauche, délétion avec site de restriction pour HindIII | AAGCTTACGTTGATTTAATATTGCTTGTG | 29 | 76,0°C ou 60,0°C | 31,03 |
| PrCiSst5Hind | Promoteur - C. intybus - gène de la SST - am. Gauche, délétion avec site de restriction pour HindIII | AAGCTTGGTAGAAAGCAATAGGCAGG | 26 | 76,0°C ou 60,0°C | 46,15 |
| SeqPrSSRg1 | Séquencage de la partie interne du promoteur de la SST(1500bp) - am. Gauche | ACCATTGTAGCTGTGGGA | 18 | 54°C | 50 |
| SeqPrSSTd1 | Séquencage de la partie interne du promoteur de la SST(1500bp) - am. Droite | GATATTTAATTGGAAAAGAGC | 21 | 54°C | 28,57 |
| GwCiFftPrIn2 | Genome Walker - C. intybus - Gène FFT - Promoteur - am. Interne n°2 | CRTTGCTGCACCGTAAAATATAAGCA | 26 | 72°C | 38,46 |
| SSTprSqP3 | Séquencage sur SST3000bp | AACACAACATTTAAGGGACC | 20 | 56°C | 40 |
| GUSd | Amorce droite sur GUS | CGTCACCGAGGCTGTCGACGA | 21 | 70°C | 56.16 |
| GUSg | Amorce gauche sur GUS | GGCATCCGGTCAGTGGCAGTGAA | 23 | 74°C | 56.54 |
| M13F | Amorce universelle M13 forward | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | 24 | | |
| M13G | Amorce universelle M13 reverse | AGCGGATAACAATTTCAACACAGGA | 24 | | |
| AgTgmdh51 | Amorce gauche pour Agrobacterium (glucosaminitol dehydrogenase) | CCGCCGATATTTATGACGAC | 20 | 60°C | 50 |
| AgTgmdh31 | Amorce droite pour Agrobacterium (glucosaminitol dehydrogenase) | TTTTCGAGTTTGTCCAGGAG | 20 | 60°C | 50 |
| PBI121g | Amorce gauche sur pBI121 | CAATTTCAACACAGGAACAGC | 21 | 60°C | 42.86 |
| CiNDtub3 | Amorce gauche pour tubuline | GATCAACTCAGCACCTTCAG | 20 | 60°C | 50 |
| CiNDtub5 | Amorce droite pour tubuline | ACCAGATCGGAGCTAAGTTC | 20 | 60°C | 50 |

Littérature citée

1. Edelman, J. and T. Jefford, The mechanisms of fructan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New phytol*, 1968. **67**: p. 517-531.
2. Bonnet, G., *et al.*, Purification and characterization of fructans with b-2,1 and b-2,6-glycosidic linkages suitable for enzyme studies. *New phytol*, 1994. **127**: p. 261-269.
3. Koops, A. and H. Joncker, Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* Colombia. II. Purification of sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and reconstitution of fructan synthesis in vitro with purified sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase and fructan:fructan 1-fructosyl transferase. *Plant physiol*, 1996. **110**: p. 1167-1175.
4. Carpita, N., J. Kanabus, and T. Housley, Linkage structure of fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Festuca arundinaceae* leaves. *J Plant physiol*, 1989. **134**: p. 162-168.
5. Livingstone, D., N. Chatterton, and P. Harrison, Structure and quantity of fructan oligomers in oat (*Avena* spp.). *New Phytol*, 1993. **123**: p. 725-734.
6. Shiomi, N., Properties of fructosyltransferases involved in the synthesis of fructan liliaceous plants. *J Plant Physiol*, 1989. **134**: p. 151-155.
7. Inulin, an innovative food ingredient, <http://www.inulinplaza.com>, .
8. <http://www.francaise-deshydrat.com/francias/produits.asp>, .
9. <http://www.reseauproteus.net/1001solutions/c/cichoriumintybus.htm>, .
10. http://www.saveurs.symaptico.ca/ency_3/laitue/chicoree.htm, .
11. l'agriculture, M.d., *La culture de la chicorée Witloof*. 3ème ed. Août 1993: Administration de l'Agriculture et de l'horticulture, Service information.
12. Pollock, C.J. and N.J. Chatterton, *Fructan*, in *The biochemistry of plants*. 1988, Jack Preiss. p. 109-139.
13. Buchanan, Gruissem, and Jones, *Biochemistry and molecular physiology of plants*, ed. A.S.o.P. Physiologists. 2000.
14. Thomashow, M., Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory Mechanisms. *Annu rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999. **50**: p. 571-599.
15. Ingram, I. and B. Bartel, The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1996. **47**: p. 377-403.
16. Gynheung, A., *Binary Ti Plasmid Vectors*, in *Methods in Molecular Biology, Agrobacterium Protocols*, K.G.a.M.D.H. Press, Editor: Totowa.
17. Blocus continental, <http://www.snl.ch/dhs/externe/protect/textes.F13928.htm>, , Swiss National Library.
18. Les petites histoires de la grande histoire, L'histoire du sucre, <http://www.lodace.com/histoire/outils/sucre.htm>, , Lodace, Histoire.
19. Dey, J., Arrachons la chicorée, forçons l'endive !, . 1991.
20. <http://perso.libetysurf.fr/larodz/plantes/chicoree.html>, .
21. Situation de la filière chicorée à inuline en Belgique - Campagne 1999-2000, <http://cmlag.fgov.be/dg2/fr/secteur/s-inuline2.htm>, .
22. <http://belgium.fgov.be/figures/fr04.htm>, .
23. Lachance, M., Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Anthonie van leeuwenhoek international journal of general and molecular biology*, 1995. **68**(2): p. 151-160.
24. Fuchs, A., Current and potential food and non-food applications of fructans. *Redesigning Crop Products for Biotechnology*, 1991. **19**.

25. Delzenne, N. and M. Roberfroid, Physiological effects of non-digestible Oligosaccharides. *Lebensm Wiss u Technol*, 1994. **27**: p. 1-6.
 26. Gibson, G., *et al.*, Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology*, 1995. **108**: p. 975-982.
 27. Meghrou, J., *et al.*, Screening of Bifidobacterium strains for bactericin production. *Biotechnology letters*, 1990. **12**: p. 575-580.
 28. Inubio® forte, inulin Tablets, <http://www.hankintatukku.com/inulin.html> .
 29. Modler, H., R. McKellar, and M. Yagucchi, Bifidobacteria and bifidogenic factors-review. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.*, 1990. **23**: p. 29-41.
 30. Miller-Catchpole, R., *Bifidobacteria in clinical microbiology and medicine.*, in *Biochemistry and physiology of Bifidobacteria*, F.C.P. Boca Raton, Editor. 1989, Bezkorovainy, A. Miller-Catchpole. p. 177-197.
 31. Tamura, Z., Nutriology of Bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*, 1983. **2**: p. 3-16.
 32. Mendoza, E., *et al.*, Inulin as fat substitute in low fat, dry fermented sausages,. *Meat Science* (Elsevier), 2001. **57**: p. 387-393.
 33. Drake, M. and B. Swanson, Reduced and low fat cheese technology. *Trends in Foods Science and Technology*, 1995. **6**: p. 366-369.
 34. Izzo, M. and A. Franck, Nutritional and health benefits of inulin and oligofructose conference. *Trends in Food Science and Technology*, 1998. **9**: p. 255-257.
 35. Roberfroid, M., N. Kok, and N. Delzenne, *Chicory fructooligosaccharides : are they effective in modulating lipid metabolism?*, in *Proceeding of the International Symposium "Nondigestible oligosaccharides: healthy food for the colon?"*, H. R. Editor. 1997: The Netherlands:Wageningen. p. 162.
 36. Yun, J., *et al.*, Production of inulo-oligosaccharides from inulin by immobilized endoinulinase from *Pseudomonas* sp. *J Ferment Bioeng*, 1997. **84**: p. 367-71.
 37. Niness, K., Inulin and oligofructose : what are they? *J. Nutr*, 1999. **129**(7 suppl): p. 1402s-6s.
 38. Inulin analog, http://www.bodywise.com/products/ingredients/inulin_analog.htm?valid=9999404 .
 39. Fuchs, A., *Starch*, 1987. **39**: p. 335-343.
 40. Gretz, N., *Inulin and Inulin-Containing crops*. 1991, Amsterdam: Elsevier Sci. Publ.
 41. Ashford, M. and J. Fell, Targeting drugs to the colon: delivery systems for oral administration . *Journal of Drug targeting*, 1994. **2**(3): p. 241-257.
 42. Vandamme, T.F., *et al.*, The use of polysaccharides to target drugs to the colon. *Carbohydrate polymers* (Elsevier), 2002. **48**: p. 219-231.
 43. Carpita, N. and D. Gibeaut, Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The plant journal*, 1993. **3**: p. 1-30.
 44. Hendry, G. and R. Wallace, *The origin, distribution, and evolutionary significance of fructans.*, in *Science and Technology of fructans*, C. Press, Editor. 1993, M. Suzuki
- NJ. Chatterton: FL, Boca Raton. p. 119-139.
45. Pilon-Smits, E., *et al.*, Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol*, 1995. **107**: p. 125-130.
 46. Pollock, C. and A. Cairns, Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annu rev Plant physiol Plant Mol Biol*, 1991. **42**: p. 77-101.
 47. Dedonder, R., Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Methods Enzymol*, 1966. **8**: p. 500-505.

48. Ernst, M., N. Chatterton, and P. Harrison, Purification and characterization of a new fructan series from species of Asteraceae. *New Phytol*, 1996. **132**: p. 63-66.
49. Liu, J., A. Waterhouse, and N. Chatterton, Proton and carbon NMR chemical-shift assignments for [β -D-Fru f-(2 \rightarrow 1)] β 3-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glc p (nystose) and [β -D-Fru f-(2 \rightarrow 1)] β 4-(2 \rightarrow 1)- α -D-Glc p (1,1,1-kestopentaose) from two-dimensional NMR spectral measurements. *Carbohydr Res*, 1993. **245**(1): p. 11-9.
50. Obenland, D., *et al.*, Regulation of Sucrose-sucrose-Fructosyltransferase in Barley leaves. *Plant Physiol*, 1991. **97**: p. 115-121.
51. Ende, W.V.d. and A.V. Laere, Purification and properties of an invertase with sucrose : sucrose fructosyltransferase (SST) activity from the roots of *Cichorium intybus*. *New Phytol*, 1993. **123**: p. 31-37.
52. Ende, W.V.d., *et al.*, Purification and characterization of 1-SST, the key enzyme initiating fructan biosynthesis in young chicory roots (*Cichorium intybus*). *Physiologia Plantarum*, 1996. **98**: p. 455-466.
53. Pollock, C., Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plant. *New Phytol*, 1986. **104**: p. 1-24.
54. Praznik, W. and R. Beck, Inulin composition during growth of tubers *Helianthus tuberosus*. *Agric. Biol. Chem*, 1987. **51**: p. 1593-1599.
55. Claessens, G., A.V. Laere, and M.D. Proft, Purification of an inulinase from Chicory roots (*Cichorium intybus* L.). *Plant physiology*, 1990. **136**: p. 35-39.
56. Roover, J.D., *et al.*, Purification and properties of a second fructan exohydrolase from the roots of *Cichorium intybus*. *Physiologia Plantarum*, 1999. **106**: p. 28-34.
57. Copeland, L., Enzymes of sucrose metabolism. *Methods Plant Biochem*, 1990. **3**: p. 73-85.
58. Ende, W.V.d., *et al.*, Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. *The Plant Journal*, 2000. **24**(4): p. 447-456.
59. Vijn, I. and S. Smeekeens, Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiol.*, 1999. **120**: p. 351-359.
60. Wiemken, A., N. Sprenger, and T. Boller, *Fructan : an extension of sucrose by sucrose*, in *Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology*, A.S.o.P. Physiologists, Editor. 1995, HG Pontis, GL Salerno, EJ Echeverria: Rockville. p. 178-189.
61. Levitt, J., *Responses of plants to environmental stresses*, ed. n. ed. 1980: New York: Academic.
62. Crowe, J., J. Carpenter, and L. Crowe, THE ROLE OF VITRIFICATION IN ANHYDROBIOSIS. *Annu. Rev. Physiol*, 1998. **60**: p. 73-103.
63. McKersie, B. and S. Bowley, *Active oxygen and freezing tolerance in transgenic plants*, in *Plant cold hardiness, Molecular biology, Biochemistry and physiology*. 1997, .: New York. p. 203-214.
64. Liming, X. and Z. Jian-Kang, Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia plantarum*, 2001. **112**: p. 152-166.
65. Stockinger, E., S. Gilmour, and M. Thomashow, *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997. **94**: p. 1035-1040.
66. Maniatis, T., E. Fritsch, and J. Sambrook, *Molecular cloning a laboratory manual*. 2d ed. 1989: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
67. Leblanc, B. and T. Moss, *DNase I Footprinting*, in *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols*, G. Kneale, Editor. 1994, Humana Press Inc.: Totowa. p. 1-5.

68. Metzger, W. and H. Heumann, *Footprinting with exonuclease III*, in *DNA-Protein Interactions: Principles and Protocols*, G. Kneale, Editor. 1994, Humana Press Inc.: Totowa. p. 11-14.
69. Shaw, P. and A. Stewart, *Identification of Protein-DNA Contacts with Dimethyl Sulfate*, in *DNA-Protein Interactions: Principles and protocols*, G. Kneale, Editor. 1994, Humana Press Inc.: Totowa. p. 79-81.
70. Papavassiliou, A., *AG. 1,10-Phenanthroline-Copper Ion Nuclease Footprinting of DNA-Protein Complexes in situ Following Mobility-Shift Electrophoresis Assays*, in *DNA-protein Interactions: principles and protocols*, G. Kneale, Editor. 1994, Humana Press Inc.: Totowa. p. 43-52.
71. Himber, C., Technique de transfert d'acides nucleiques : le canon à particules. <http://ibmp.u-strasbg.fr>, .
72. Zambryski, P., Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer story. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol*, 1992. **43**: p. 465-490.
73. Zupan, J. and P. Zambryski, Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant physiol*, 1995. **107**: p. 1041-1047.
74. Stitt, M., Regulation of metabolism in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Palt Mol. Biol.*, 1995. **46**: p. 341-368.
75. Fits, L.v.d., *et al.*, The ternary transformation system : constitutive *virG* on a compatible plasmid dramatically increases *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant molecular Biology*, 2000. **43**: p. 495-502.

Abréviation

| Abréviations et acronymes | Signification |
|------------------------------|--|
| € | euros |
| °C | degrés Celsius |
| μF | microfarad |
| μl | Microlitre |
| μm | Micron |
| ABA | Acide Abscissique |
| ABRE | ABA responsive element |
| ADN | Acide Désoxyribonucléique |
| ADNc | ADN complémentaire |
| ADNds | ADN double brin |
| ADNg | ADN génomique |
| ADNss | ADN simple brin |
| APS | Ammonium PerSulfate |
| ARN | Acide Ribonucléique |
| ARNm | ARN messenger |
| AS | Acétosyringone |
| BET | Bromure d'Ethidium |
| bp | paire de bases |
| <i>C. intybus</i> | <i>Cichorium intybus</i> |
| <i>C. perfringens</i> | <i>Clostridium perfringens</i> |
| CaMV | Cauliflower Mozaïc Virus |
| CAT | Chloramphénicol Acétyl Transférase |
| CIV | Culture In Vitro |
| cm | centimètre |
| COR | Cold Regulated |
| DP | Degré de Polymérisation |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DMSP | diméthylsulfoniopropionate |
| DO | densité optique |
| DRE | Dehydration Responsive Element |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | EthyleneDiamineTetraAcetic acid |
| EMSA | Electrophoretic Mobility Shift Assay |
| F | Fructose |
| fb | francs belges |
| FEH | Fructane ExoHydrolase |
| FFT | Fructane : fructane fructosyle transférase |
| FH | Fructane Hydrolase |
| G | Glucose |
| g | gramme |
| GW | Genome Walker |
| ha | hectare |
| IPTG | Isopropyl-b-D-Thiogalactopyranoside |
| kb | kilobase |
| kDa | kiloDalton |
| kg | kilogramme |
| kV | kiloVolt |
| LB | Left Border |

| | |
|-----------|--|
| LEA | Late Embryogenesis Abundant |
| M | Molaire |
| MCS | Multiple Cloning Site |
| Mda | MégaDalton |
| mg | milligramme |
| milieu LB | Milieu Luria-Bertani |
| min | minute |
| ml | Millilitre |
| mM | millimolaire |
| MS | Murashige et Skoog |
| nm | nanomètre |
| ORF | Open Reading Frame |
| PCI | Phénol-Chloroforme-Isoamylique |
| PCR | Polymerisation Chain Reaction |
| PM | Poids Moléculaire |
| pm | picomole |
| PR | Pathogenes Related |
| QTL | Quantitative Trait Loci |
| RB | Right Border |
| s | seconde |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| SL | Smart Ladder (Eurogentec®) |
| SST | Sucrose : sucrose fructosyle transférase |
| TAE | Tris Acetate EDTA |
| TBE | Tris Borate EDTA |
| T-DNA | Transfert-DNA |
| TE | Tris-EDTA |
| TEMED | TetraMethylEthyleneDiamine |
| Ti | Tumor inducing |
| U | unité |
| UV | Ultra-violet |
| ? | ohm |
| X-gal | 5-bromo-4-chloro-3-Indolyl-b-D-galactopyranoside |
| X-glc | 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-glucuronide |